OPHTHALMO-
FLUORESZENZPHOTOMIKROSKOPISCHE TECHNIK
IM TIEREXPERIMENT

Beobachtungen und vergleichende Auswertungen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

GABRIELA CHIORALIA

aus

BUKAREST/RUMÄNIEN

BONN 1977

1976

OPHTHALMO-FLUORESZENZPHOTOMIKROSKOPISCHE TECHNIK IM TIEREXPERIMENT

Beobachtungen und vergleichende Auswertungen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

GABRIELA CHIORALIA

aus

BUKAREST/RUMÄNIEN

BONN 1977

Angefertigt mit Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Bonn

1. Referent: Professor E. Scholtyseck

2. Referent: Professor H. Baurmann

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juni 1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus dem Zoologischen Institut der Universität Bonn
Direktor: Professor Dr. H. Schneider

Abteilung für Protozoologie
Leiter: Professor Dr. E. Scholtyseck

und der Universitäts-Augenklinik Bonn
Direktor: Prof. Dr. W. Best

Druck: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Herrn Professor Dr. H. Baurmann spreche ich für die Themenstellung und seine freundliche Unterstützung meinen verbindlichen Dank aus.

Herrn Professor Dr. E. Scholtyseck danke ich für freundliche Unterstützung und Hilfe.

Herrn Professor Dr. O. Hockwin danke ich besonders für die Hilfe bei der Abfassung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. K. Sasaki danke ich für die Unterstützung während der Ausführung der experimentellen Arbeiten.

Herrn Privatdozent Dr. H.-R. Koch danke ich für die so wertvolle und mühevolle Hilfe in der Zusammenstellung des Literaturverzeichnisses.

Ebenfalls danke ich Herrn V. Dragomirescu für die unermüdliche Hilfe bei der makroskopischen Photographietechnik und den präzisen Zeichnungen, Frau B. Engler für das genaue und ästhetische Schreiben der Arbeit.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523702_0011

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1	Problemstellung	7
2	Einführung	8
2.1	Die Fluoreszenz	8
2.2	Fluorescein-Natrium, Chemie und Pharmakologie	9
2.3	Anwendung des Fluorescein-Na in der Ophthalmologie	11
2.4	Diagnostische Möglichkeiten der Fluoreszenz-Angiographie	11
2.5	Mikroskopische Untersuchungen nach Fluorescein-Na Injektion	13
2.6	Technische Voraussetzungen zur Mikroskopie des Fluorescein-Na	14
3	Experimenteller Teil	19
3.1	Tiermaterial	19
3.2	Fluorescein-Na Injektion	19
3.3	Kryostatschnitte von tiefgefrorenen Augen	20
3.4	Paraffinschnitte von gefriergetrockneten Augen	21
3.5	Paraffinschnitte von vakuumgetrockneten Augen	23
3.6	Fluoreszenzphotomikroskop	24
3.6.1	Verwendete Mikroskoptypen	24
3.6.2	Filterkombinationen	25
3.6.3	Filmmaterial	26
4	Ergebnisse	28
4.1	Kryostatschnitte tiefgefrorener Augen	28
4.1.1	Sofortbeobachtung	28
4.1.2	Auf Objektträgern lyophilisierte Schnitte	30
4.2	Paraffinschnitte lyophilisierter Augengewebe	34
4.2.1	Vakuumtrocknung bei -80° C	34
4.2.2	Vakuumtrocknung bei -40° C	37
4.2.3	Vakuumtrocknung bei -20° C	42
4.2.4	Vakuumgetrocknete Augengewebe	44
4.2.5	Abwandlung des Trocknungsverfahrens	48

Seite

4.2.6 Veränderte Einbettung 53
4.2.6.1 Zeitfaktor 53
4.2.6.2 Temperaturfaktor 54
4.2.7 Alter der Schnitte und der Präparate 56

4.3 Filmmaterial 57

4.4 Ergebnistabelle 62

5 Diskussion 64

5.1 Versuchstiere 64

5.2 Lokalisation des Fluorescein-Natriums 67

5.2.1 Kryostattechnik 69
5.2.2 Lyophilisierung 71
5.2.3 Lyophilisations-Temperatur 72
5.2.4 Phosphorpentoxyd in der Lyophilisation 74

5.3 Unterschied Primärfluoreszenz - Sekundärfluoreszenz 76

5.3.1 Wassergehalt der Gewebe 78
5.3.2 Einbettung 79
5.3.3 Schnittdicke 80
5.3.4 Strukturveränderung 82
5.3.5 Alter der Präparate 82

5.4 Fluoreszenzmikroskopische Dokumentierung 83

5.4.1 Fluoreszenzmikroskop 83
5.4.2 Filter 85
5.4.3 Filmmaterial 92

6 Gesamtergebnis 96

7 Ausblick 98

8 Zusammenfassung 99

9 Literaturverzeichnis 100

1 Problemstellung

Seit NOVOTNY & ALVIS 1960/61 die Fluoreszenzangiographie in die Augenheilkunde einführten, beschäftigte man sich des öfteren mit der Frage, unter welchen Bedingungen der Austritt des Fluorescein-Farbstoffes aus den Gefäßen erfolgt.

Die Literatur enthält zahlreiche Angaben zu Untersuchungen dieses Problems. Die dabei mitgeteilten Ergebnisse differieren jedoch außerordentlich stark. Dies dürfte vor allem auf technischen Mängeln der angewandten Methoden beruhen. Mit Sicherheit spielt die Diffusionsfähigkeit des Fluorescein-Na in wäßriger Phase eine große Rolle bei den unterschiedlichen Ergebnissen. In Abhängigkeit von der Gewebefixation und von der zur Verfügung stehenden Zeit einer Farbstoff-Diffusion wird man unterschiedliche Lokalisationen im histologischen Schnitt feststellen können.

Es war Aufgabe dieser Arbeit, einen Vergleich verschiedener Methoden für die histologische Lokalisation des Fluorescein-Na in Geweben des hinteren Augapfels und der Iris durchzuführen. Dadurch sollten optimale Bedingungen geschaffen werden, die vor allem eine bessere Differenzierung von Primärfluoreszenz (Eigenfluoreszenz der Gewebe) und Sekundärfluoreszenz (Farbstofffluoreszenz) erlauben würden.

2 Einführung

2.1 Fluoreszenz

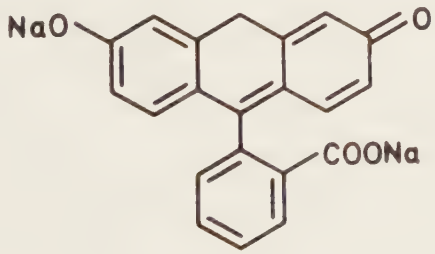
Die Eigenschaften einiger Stoffe, elektromagnetische Strahlen zu absorbieren und als Strahlen gleicher oder veränderter Wellenlänge wieder zu emittieren, wird Fluoreszenz genannt. Zum Unterschied zur Phosphoreszenz erlischt die Emission des fluoreszierenden Körpers praktisch mit dem Sistieren der erregenden Strahlung. Die anregenden elektromagnetischen Strahlen können die Atome bestimmter Stoffe in einen höheren Energiezustand versetzen; in Form der emittierten Strahlung wird diese Energie wieder abgegeben und das Atom in seinen Grundzustand zurückversetzt. Diese Vorgänge spielen sich vor allem in der Elektronenhülle der Atome ab. Die abgegebene Energie ist gleich oder kleiner als die aufgenommene. Deshalb ist die Wellenlänge der emittierten Strahlung gleich oder meist länger, wenn nicht andere Erregungsmechanismen diesen Vorgang zusätzlich beeinflussen.

In der Medizin findet die Fluoreszenz Anwendung, um z.B. Strukturen im Mikroskop sichtbar zu machen. Außerdem kann ein fluoreszierender Farbstoff in die Blutbahn eingebracht werden, wie Fluorescein-Na, um festzustellen, ob der Farbstoff - und damit das Blut - in physiologischen Zeiten einen bestimmten Punkt des Organismus erreicht, oder ob Lecks im Gefäßsystem bestehen. Die Intensität der Fluoreszenz eines in die Blutbahn eingebrachten fluoreszierenden Farbstoffs ändert sich mit der

Konzentration im Blut und dessen pH-Wert (SCHARF, 1956) sowie der Temperatur und der Viskosität. Die Intensität der Fluoreszenz von Fluorescein-Na im Blut nimmt bis zu einer Konzentration von 10^{-4} g% direkt proportional zu. Mit steigender Konzentration wird die Ausbeute an Fluoreszenz aufgrund von Löschungserscheinungen geringer (BAURMANN, 1969). Das Intensitätsmaximum liegt bei einer Konzentration von 10^{-3} bis 10^{-2} g%.

2.2 Fluorescein-Na, Chemie und Pharmakologie

Fluorescein-Na - mit einem Molekulargewicht von 373,3 - ist das Natriumsalz des Fluoresceins. Es ist in Wasser leicht löslich.



Strukturformel des Fluorescein-Na

Das Excitations- und Emissionsspektrum wurde von verschiedenen Autoren untersucht (NOVOTNY & ALVIS, 1960/1961; DOLLERY et al., 1962; OOSTERHUIS & LAMMENS, 1965; HICKHAM & FRASER, 1965/1966; KRÜGER, 1967; BAURMANN 1969, 1971). Das Maximum der

Excitation wurde bei Wellenlängen von 465 - 495 nm angegeben, das der Emission zwischen 505 und 535 nm, meistens bei 520 nm.

Wird Fluorescein-Na in die Blutbahn gebracht, lagert es sich z.T. an die Serumproteine infolge der van der Waalschen Kräfte an, vor allem an die Albumine. Über das Verhältnis von gebundenem zu freiem Fluorescein-Na im Blut werden verschiedene Angaben gemacht (LANGE & BOYD, 1942/1943 - 40 %; HODGE & DOLLERY, 1964 - 50-84 %). Mit der Bindung an Proteine nimmt die Fluoreszenz ab. Sie beträgt nur noch 20 % des Excitationslichtes (LAURENCE, 1952). Ein Teil der Fluoreszenz wird auch durch Hämoglobin absorbiert (DOLLERY et al., 1962).

Die Ausscheidung des Farbstoffes erfolgt über die Niere (LANGE & BOYD, 1941/1943; GOLDMANN 1950/1951). DOLLERY et al. (1962) haben eine Clearence gemessen, die dem 2 bis 3fachen der glomerulären Filtration entspricht. Von GRAFFLIN (1947) wurde auch eine Ausscheidung des Farbstoffs über die Leber in die Galle beobachtet. Während der Passage durch die Blutbahn und der Ausscheidung unterliegt Fluorescein-Na keiner chemischen Veränderung.

Der Farbstoff ist nicht toxisch. An Tieren wurde eine letale Dosis von 2 bis 3 g/kg Körpergewicht festgestellt, das entspricht dem 100fachen der klinischen Dosis (EMERSON & ANDERSON, 1934). In einzelnen Fällen wurden allergische Erscheinungen nach intravenöser Applikation beobachtet (SCOTT et al., 1964).

2.3 Anwendung des Fluorescein-Na in der Ophthalmologie

Fluorescein-Na dient in der Augenheilkunde unter anderem zur Untersuchung des Kreislaufs der Netzhaut, der Regenbogenhaut und in beschränktem Maße der Aderhaut. Dazu werden 5 - 10 ml einer 5 - 20 %igen wäßrigen Lösung von Fluorescein-Na in die Cubitalvene appliziert und Serienaufnahmen des Augenhintergrundes bzw. der Iris durchgeführt. Zur Darstellung der Netzhautgefäße wird eine Funduskamera mit Blitzaggregat benützt, in deren Beleuchtungsstrahlengang ein Blaufilter angebracht ist, so daß nur Licht der Wellenlänge auf die Netzhaut trifft, das den Farbstoff in den Gefäßen zur Fluoreszenz anregen kann. Vor die Filmebene wird ein Kantenfilter angebracht, um das reflektierte Erregerlicht zu eliminieren, und nur das Emissionssprektrum des Farbstoffs passieren zu lassen. Entsprechend der unterschiedlichen Angaben über die Excitations- und Emissionsmaxima wurden von den verschiedenen Autoren unterschiedliche Filterkombinationen angegeben (NOVOTNY & ALVIS, 1960/1961; DOLLERY et al., 1962; OOSTERHUIS & LAMENS, 1965; WESSING, 1968; BAURMANN, 1969, 1971).

2.4 Diagnostische Möglichkeiten der Fluoreszenz-Angiographie

Wie schon erwähnt kann mit Hilfe der Serienphotographie nach Injektion von Fluorescein-Na der dynamische Vorgang der

Passage des Farbstoffs durch die sichtbaren Blutgefäße des Auges dokumentarisch festgelegt werden. Von der Cubitalvene bis zur Netzhaut benötigt der Farbstoff bei mittlerer Schlagfrequenz des Herzens 8 - 13 Sekunden. Besteht ein Hindernis, wie z.B. ein Verschluß der Arteria centralis retinae, verlängert sich die "Arm-Retina-Zeit". Nach der Anfärbung der Netzhautarterien beobachtet man die Füllung der Kapillaren und Venen. Störungen im Abfluß werden wiederum durch Verlängerung der Zirkulationszeit deutlich.

Während bei der Betrachtung des Augenhintergrundes mit dem Ophthalmoskop kleine Blutungen nicht von Mikroaneurysmen unterschieden werden können, gestattet die Fluoreszenzangiographie eine Differenzierung. Normalerweise sind die Netzhautgefäße für Fluorescein-Na nicht durchlässig. Das gilt auch für die Gefäße der Iris, der Conjunctiva und des corneo-skleralen Limbus. Im Gegensatz dazu stehen die Chorioideagefäße.

Die Unpassierbarkeit der Gefäßwände der Retina für bestimmte Stoffe wird als Blut-Retina-Schranke bezeichnet. Ein ähnliches System kennen wir in der Blut-Gehirn-Schranke. Zahlreiche Autoren haben sich mit der Blut-Retina-Schranke beschäftigt (ASHTON, 1949, 1950, 1965; ASHTON et al., 1962, 1965a, 1965b, 1966b; SHAKIB et al., 1966, 1967).

Eine der Ursachen für diese Schranke wird wohl im Aufbau der Wandungen der Netzhautkapillaren liegen. Nach den Untersuchungen von ROHEN (1968) und anderen gehören die Retinakapillaren zum Typ 1 mit geschlossenem Endothel, während die chorioidalen Kapillaren dem Typ 3 mit gefenstertem Endothel zuzurechnen sind (ROHEN, 1968; BERNSTEIN & HOLLENBERG, 1965;

SHAKIB & CUHNA-VAZ, 1966).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten die Ähnlichkeit im Aufbau der Gehirn- und der Netzhautgefäße (HOGAN & FEENEY, 1963a; GÄRTNER, 1966). Im Angiogramm bedeutet daher Austritt von Farbstoff aus den Gefäßen der Netzhaut immer eine Permeabilitätsstörung. Die Aderhautfluoreszenz ist als sogenanntes "background mottling" zu erkennen, aber auch von hier tritt normalerweise kein Fluorescein, das im Angiogramm sichtbar wäre, in die Netzhaut ein. BAURMANN (1972) spricht deshalb von einer Zweitschranke.

2.5 Mikroskopische Untersuchungen nach Fluorescein-Na Injektion

Ganz impermeabel scheinen die Netzhautgefäße für Fluorescein-Na nicht zu sein, wie BAURMANN aufgrund seiner Befunde (1969, 1970, 1971) annimmt. Dabei soll der nicht an Eiweiß gebundene Farbstoff in geringen Mengen die Gefäße der Retina passieren können. Dieses "freie Fluorescein" soll auch von der Choriokapillaris aus in die äußeren Schichten der Netzhaut durch die Bruchsche Membran und das retinale Pigmentepithel dringen können. Histologische Untersuchungen von GRAYSON & LATIES (1971) widersprechen dieser Ansicht BAURMANNs. Dagegen berichten auch MIZUNO et al. (1972, 1974) und SASAKI (1973) über Farbstoffaustritte nach i.v. Applikation aus der Cho-

rioidea in die Netzhaut. OTA & TSUKAHARA (1971) beobachteten wie BAURMANN (1969, 1971) nach Injektion des Farbstoffs in die Blutbahn eine diffuse Fluoreszenz der inneren Retinaschichten bis hin zur äußeren Körnerschicht. Demnach müßte also der Farbstoff aus den Gefäßen der Netzhaut ausgetreten sein.

Die Diskrepanz der Befunde trotz ähnlicher Untersuchungstechniken ließ es wünschenswert erscheinen, eine sichere, ausgewogene Technik der Fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zu erarbeiten und der Frage der Farbstoffdiffusion nachzugehen.

2.6 Technische Voraussetzungen zur Mikroskopie des Fluorescein-Na

Für die Fluoreszenz-Mikroskopie sind einige technische Einzelheiten der zu verwendenden Filter von Wichtigkeit, da hiervon die Anregung des Fluoresceins sowie seine mikroskopische Darstellung auf den Filmen in starkem Maße abhängt.

Die Angaben der Autoren über die Maxima der Excitation und Emission des Fluorescein-Na sind unterschiedlich. Für die Excitation sind in der Literatur Werte von 465 nm (OOSTERHUIS & LAMMENS, 1965) über 480 nm (BAURMANN, 1969, 1971; KRÜGER, 1967) bis hin zu 490 nm, dem am häufigsten angegebenen Wert (DOLLERY et al., 1962; NOVOTNY & ALVIS, 1960/1961; WESSING, 1968, u.v.a.m.) zu finden. Das Maximum der Emission liegt zwi-

schen etwa 505 und 520 nm und wird von den verschiedenen Autoren ebenfalls übereinstimmend angegeben. Entsprechend diesen Werten wählten die verschiedenen Autoren die ihnen am günstigsten erscheinenden Filterkombinationen, die im Prinzip auch für die hier zu besprechende Fluoreszenz-Mikroskopie gelten.

Unter anderem hat BAURMANN (1969, 1971) eingehende methodische und technische Untersuchungen durchgeführt, um bei der Fluoreszenz-Angiographie des menschlichen Augenhintergrundes möglichst optimale Bedingungen zu erarbeiten. Die dort gefundenen Ergebnisse sind in Analogie auch auf die Fluoreszenz-Mikroskopie übertragbar. BAURMANN stellt fest, daß ein wesentlicher Faktor die zur Verfügung stehende Lichtenergie darstellt. Bei geeigneter Wahl von Filtern, Filmen und Farbstoffkonzentrationen und -mengen, benötige man mindestens 380 Watt-Sekunden, um die durch Fluorescein-Na hervorgerufene Sekundärfluoreszenz am Augenhintergrund photographisch darzustellen. Die besseren Ergebnisse seien mit etwas höherer Energie, nämlich 480 oder 560 Watt-Sekunden zu erzielen.

Dabei ist davon auszugehen, daß diese Untersuchungen mit der Fluoreszenz-Funduskamera von Zeiss vorgenommen wurden, bei der, wie BAURMANN (1969) nachweisen konnte, optische und lichtenergetische Verhältnisse für die Fluoreszenz-Angiographie (für welche die Zeiss-Funduskamera ursprünglich nicht konzipiert war) recht ungünstig liegen. Hieraus ist wohl zu erklären, daß später konstruierte Fluoreszenz-Funduskameras wie die von TOPCON, schon mit einer Lichtenergie von 300 Watt-Sekunden vollauf auskommen. Beim Fluoreszenz-Mikroskop sind die Verhältnisse zwischen Optik und Lichtenergie wesentlich

günstiger, so daß für die Fluoreszenz-Mikroskope nicht so hohe Lichtenergien benötigt werden.

Ein weiterer wesentlicher Faktor für eine gute Fluoreszenzdarstellung stellen die Filter bzw. die Filterkombinationen dar. Als besonders günstige Erregerfilter erwiesen sich:

1. das BAIRD-atomic B4-Filter,
2. das SCHOTT BG 12-Filter (1 mm dick), das SCHOTT Kantenfilter 477 nm und das KODAK-Wratten Filter 47 B.

Als gut geeignete Sperrfilter zeigten sich: SCHOTT GG 14, SCHOTT OG 1, SCHOTT OG 4, und der KODAK-Wratten-Filter 58. Das BAIRD-atomic B4-Filter ist ein besonders günstiger Kantenfilter mit einer noch relativ breiten Basis und hoher Transmission. Die für die Fluoreszenzangiographie besonders günstigen Filterpaarungen sind nach BAURMANN die folgenden:

1. BAIRD-atomic B4 + SCHOTT GG 14,
2. SCHOTT BG 12 (1 mm) + SCHOTT OG 1,
3. SCHOTT Kantenfilter 477 nm + SCHOTT OG 4 sowie
4. KODAK-Wratten-Filter 47 B + KODAK-Wratten-Filter 58.

Die zuerst genannten drei Kombinationen benötigen bei der Fluoreszenzangiographie 480 - 560 Watt-Sekunden für gute Fluoreszenzaufnahmen, während die vierte Kombination eine höhere Energie - mindestens 680 Watt-Sekunden - erfordert, um qualitativ gleiche Bilder zu gewinnen.

Unter den Filmen wurden für die Zwecke der Fluorescein-Fundusphotographie insbesondere pan-chromatische Kodak-Filme wie Plus-X-pan (23° DIN) und Tri-X-pan (27° DIN) erfolgreich verwandt, die 11 bis 12 Minuten in Kodak-D 76 Entwickler bei 21° C behandelt wurden.

Die Fluorescein-Natriumlösung wird von den meisten Untersuchern für die Angiographie beim Menschen in 10 %iger Konzentration in einer Menge von 5 - 10 ml appliziert.

Für die Darstellung guter Fluoreszenzbilder bei Fluoreszenzangiographie und Fluoreszenzmikroskopie ist ferner das spektrofluorometrische Verhalten des Fluorescein-Farbstoffs von Wichtigkeit. Die vorher erwähnten unterschiedlichen Angaben über Maxima von Excitation und Emission des Farbstoffs (Excitation 465-495 nm und Emission 505-535 nm), wie sie von verschiedenen Autoren angegeben werden (z.B. BAURMANN, 1969, 1971; DOLLERY et al., 1962; FERRER, 1965; KRÜGER, 1967; NOVOTNY & ALVIS, 1960/1961; OOSTERHUIS & LAMMENS, 1965; WESSING, 1968), sind für spektrofluorometrische Messungen von Interesse, wie sie von HICKAM & FRASER (1965) und KRÜGER (1967) durchgeführt wurden. KRÜGER lehnte sich an die von HICKAM & FRASER mitgeteilten Messungen an. Hierbei wurden folgende Lösungen verglichen:

1. eine 5 %ige Fluorescein-Natriumlösung wurde mit Pufferlösung auf eine 1 %ige Lösung verdünnt,
2. eine 5 %ige Fluorescein-Natriumlösung wurde mit destilliertem Wasser auf eine 1 %ige Lösung verdünnt,
3. 100 ml Pferdeserum wurden 10 %igem Fluorescein-Na portionsweise zugesetzt in Mengen von jeweils 0,2 ml, insgesamt von 0,2 bis 2 ml,
4. 4 ml Blut + 1 ml 3,8 %iges Natrium-Citricum wurden mit 0,1 ml und mit 0,2 ml der 10 %igen Fluorescein-Natriumlösung vermischt.

Dann wurden Messungen an einem Farrand-Optical-Spektrofluorometer vorgenommen. Dabei schwankte beim dritten Gemisch (Pfer-

deserum + 10 %iges Fluorescein-Na) das Maximum der Excitation zwischen 475 und 485 nm. Bei den anderen Proben lag das Excitationsmaximum bei 480 nm. Das Emissionsmaximum betrug überall 520 nm.

Diese Werte sind ähnlich denen, die HODGE & CLEMETT (1969) gefunden hatten: Das Excitationsmaximum gaben sie mit 470 - 490 nm und für die Emission gaben sie 520 nm an. KRÜGER maß außerdem die Abhängigkeit einer 10 %igen Fluorescein-Natriumlösung, deren pH mit einem Sörensen-Phosphat-Puffer 1/15 M auf unterschiedliche pH-Werte eingestellt wurde; die Extinktion wurde mit einem Zeiss-Photometer bestimmt. Mit pH 6,0 wird das Extinktionsmaximum bei 485 nm erreicht. Für die anderen gemessenen pH-Werte von 7,0 und 7,4 sowie 8,0 liegt es gleichmäßig bei 490 nm.

3 Experimenteller Teil

3.1 Tiermaterial

Es wurden die Augen von insgesamt 91 Versuchstieren untersucht, und zwar:

- 14 Albino-Ratten (Inzucht der Rattus Norvegicus), Gewicht 180 - 20 g.
- 62 pigmentierte Hauben-Ratten (BDE-Stamm, Inzucht der Rattus Norvegicus), Gewicht 200 - 230 g.
- 8 pigmentierte Kaninchen (Oryctolagus cuniculus), Gewicht 3,0 - 3,4 kg.
- 7 Katzen (FELIS catus) älter als 3 Monate, Gewicht 3,2 - 3,6 kg.

3.2 Fluorescein-Na Injektion

Vor jedem Versuch wurden die Tiere tief anästhesiert mit Ketamin hydrochlorid i.m. 10 mg/kg Körpergewicht. Bei den Ratten und Katzen wurde ein inguinaler Schnitt angelegt, um für die i.v. Farbstoff-Injektion die Femuralvene freizulegen. Beim Kaninchen wurde die Injektion in die Ohrvene vorgenommen. Bei den Ratten folgte eine beidseitige Kanthotomie, um die Enukleation zu erleichtern.

Das rechte Auge wurde zum Kontrollauge bestimmt und vor der i.v. Fluorescein-Na Injektion enukleiert. Das enukleierte Auge wurde schnellstens in einen Dewar gebracht und in Aceton mit Trockeneis (Kohlensäureeis) sofort auf -70° bis -80° C tiefgefroren.

Dem Tier wurde dann i.v. Fluorescein-Na appliziert. Die Dosierung entsprach der normalen klinisch angewandten Dosis beim Menschen (7 mg/kg Körpergewicht). Die beim Menschen mit mittlerem Körpergewicht von 70 kg applizierten 5 ml 10 %igen Na-Fluoresceins entsprechen 0,07 ml 1 %igem Na-Fluorescein pro 100 g Körpergewicht der Versuchstiere.

Nach bestimmten Zeitabständen, nämlich 30, 45, 60, 90 und 120 Sekunden vom Beginn der i.v. Farbstoff-Injektion, wurde das linke Auge enukleiert und wie beim rechten Auge beschrieben, ebenfalls sofort und schnell in Aceton mit Trockeneis auf -70° bis -80° C tiefgefroren.

3.3 Kryostatschnitte von tiefgefrorenen Augen

Die Augen von drei albinotischen und zwei pigmentierten Ratten wurden mittels Carboxymethylcellulose (GARWEG, 1968) oder ein paar Tropfen Wasser auf dem Kryostattisch angefroren. Es wurden Schnitte von 6 - 15 µ in einem Kryostatsystem DITTES bei Temperaturen zwischen -22° und -15° C geschnitten. Die Schnitte wurden auf gut gereinigte, fluoreszenzfreie Objekt-

träger gebracht, und zwar entweder auf Objektträger außerhalb des Kryostaten* durch einfaches Annähern der Objektträger an die Schnitte, oder es wurden die Schnitte auf Objektträgern angebracht, die sich im Kryostat befanden. Ein Teil der Schnitte wurde auf den kalten Objektträgern im üblichen Verfahren angeklebt, nämlich durch kurzes Berühren des Objektträgers mit dem Finger unter dem Schnitt*. Andere Schnitte wurden auf die kalten Objektträger gelegt und so lyophilisiert.

Von den - wie oben beschrieben - auf verschiedene Weisen auf den Objektträger angebrachten Schnitten wurden einige sofort unter dem Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet; die restlichen jedoch erst nach beendeter Vakuumtrocknung.

3.4 Paraffinschnitte von gefriergetrockneten Augen

Die bereits tiefgefrorenen enukleierten Augen wurden mit einem tiefgekühlten Skalpel auf einem Stück Trockeneis geöffnet. Bei den kleineren Rattenaugen wurde lateral ein Sektor reseziert; bei den größeren Kaninchen- bzw. Katzenaugen wurde eine größere Kalotte entfernt, oder sie wurden, wenn möglich, in zwei Teile geteilt.

Nunmehr wurden die Augen oder die Augenteile in der Gefriertrocknungsanlage (High Speed Vacuum nach PEARSE) auf eine

* Das mehr oder weniger Auftauen der Schnitte ist meinen Beobachtungen zufolge ungeeignet; in der Diskussion wird hierauf noch eingegangen werden.

vorgekühlte Platte gelegt und unter ansteigendem Vakuum und gleichmäßig erhaltenen Minus-Temperaturen getrocknet. Das Vakuum dieser Pearse'schen Gefriertrocknungsanlage reicht bis zu 0,001 = 10^{-3} Torr. Die Temperaturen der Platte können zwischen -100° C und +100° C eingestellt werden.

Alle Temperatur- und Vakuumbereiche wurden getestet (vgl. Ergebnistabelle). Die Trocknungszeiten bei Temperaturen von -20 bis -80° C lagen je nach Bedingungen zwischen 4 und 144 Stunden.

Aus den getrockneten Augen wurde unter einem binocularen Mikroskop die Linse, manchmal auch der Glaskörper, entfernt. Das binoculare Mikroskop verfügte über folgende Vergrößerungen: x 6, x 12, x 25, x 50. Es wurde mit einer photographischen Kamera ausgerüstet, um die behandelten Augen hinsichtlich ihres Zustandes überprüfen zu können. Anschließend erfolgte die Einbettung der Augen bzw. Augenteile in reines Paraffin. Diese Einbettung geschah ebenfalls unter Vakuum bei der konstanten Temperatur des Paraffinschmelzpunktes. Hierzu wurde das schüttfertige Paraffin der Firma Merck mit einem Erstarrungspunkt bei 53° C benutzt. Die Vakuumwerte, bei welchen die Einbettung vorgenommen wurde, lagen zwischen 0,05 und 0,01 Torr.

Die abgekühlten Paraffinblöcke wurden im normalen Verfahren geschnitten. Die Schnittdicke lag zwischen 6 und 30 µ. Die Schnitte wurden auf gereinigten, fluoreszenzfreien Objektträgern aufgenommen und vermittels einiger Tropfen fluoreszenzfreien Paraffinöls mit ebenfalls fluoreszenzfreien Deckgläsern abgedeckt.

Die Beobachtung unter dem Fluoreszenzphotomikroskop und die photographischen Aufnahmen erfolgten unmittelbar danach.

3.5 Paraffinschnitte von vakuumgetrockneten Augen

Die tiefgefrorenen geöffneten Augen wurden auf die vorgekühlte Platte des Lyophilisationsgerätes gelegt; die Kühlung wurde abgestellt und das Gewebe unter progressiv ansteigendem Vakuum getrocknet.

Nach beendeter Trocknung wurden Linse, Glaskörper und Bulbus getrennt und makroskopisch betrachtet.

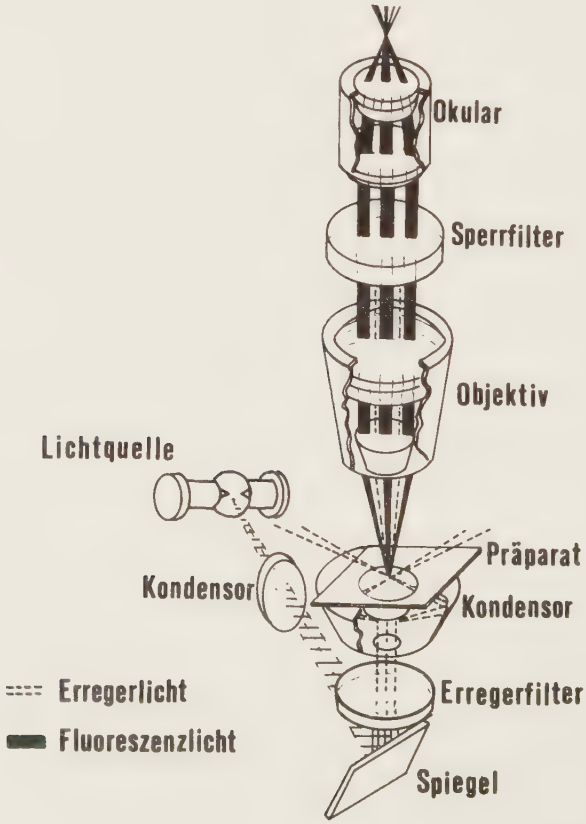
Die darauffolgende Einbettung erfolgte wieder unter Vakuum bei der konstanten Temperatur des Paraffinschmelzpunktes bis zu einem Enddruck von 0,03 Torr.

Das Schneiden und Aufkleben der Schnitte sowie deren Betrachtung und photographische Aufnahmen wurden unter den gleichen Bedingungen vollzogen wie bei den Augen, die unter Minustemperatur getrocknet wurden.

3.6 Das Fluoreszenzphotomikroskop

3.6.1 Verwendete Mikroskoptypen

Benützt wurden ein Fluoreszenzphotomikroskop mit Auflicht- und Durchlichtanregung (Zeiss, Oberkochen) und ein Fluoreszenzphotomikroskop mit Auflichtanregung (Leitz, Wetzlar). In der folgenden Abbildung ist das Prinzip eines Fluoreszenzmikroskopes schematisch dargestellt.



Die beiden Mikroskope haben als Lichtquelle eine Quecksilber-Höchstdrucklampe von 200 Watt, die sowohl in der Auflichtfluoreszenz als auch in der Durchlichtfluoreszenz angewandt werden kann. Daneben besitzen sie einen eingebauten Auflichtilluminator mit chromatischem Teilerspiegel. Das Zeiss-Fluoreszenzphotomikroskop verfügt über einen Auflichtkondensor III RS mit 4 vollständigen Filter- und Teilerspiegel-Kombinationen.

3.6.2 Filterkombinationen

Sowohl für die Erregung und Darstellung der Eigenfluoreszenz als auch für die Erregung und Darstellung der durch den injizierten Farbstoff entstehenden Sekundärfluoreszenz müssen Filterkombinationen verwandt werden, die photographische Aufnahmen erlauben. Solche Filter müssen also eine entsprechende Lichtdurchlässigkeit aufweisen, andererseits jedoch solche Strahlen eliminieren, die die Fluoreszenzerscheinungen stören. Dabei sind Überschneidungen unumgänglich, so daß Kompromißlösungen erforderlich sind.

In beiden verwandten Mikroskopen befinden sich zur Untersuchung der Excitation die Filter SCHOTT UG und BG, gefärbte Glasfilter, die das Erregerlicht großer Halbwertsbreiten ausfiltern. Sie sind kombiniert mit entsprechenden Sperrfiltern, die durch ihre Kantenlage nur die Fluoreszenz durchlassen und die Erregerstrahlung eliminieren.

Beim Zeiss-Fluoreszenz-Photomikroskop wurden der Erregerfilter UG 1 von 1 mm Dicke mit dem Sperrfilter 41, und der Erregerfilter BG 12 (3 mm) mit dem Sperrfilter 50 kombiniert. Für die Selektivanregung wurde der 2 x KP 490 = KP 500 in Kombination mit dem Sperrfilter K 510 verwendet. Zunächst wurde mit Handauslösung gearbeitet, um die besten Zeiten progressiv und regressiv für die entsprechenden Filmsorten zu testen.

Beim Leitz-Fluoreszenz-Photomikroskop standen folgende Filterkombinationen zur Verfügung: Das UG 1 - Filter von 2 mm Dicke für Ultraviolett-Anregung im Breitband-Auflicht kombiniert mit dem Sperrfilter K 430. Für Blauanregung im Breitband-Auflicht diente die Filterkombination BG 12 (3 mm) und das Sperrfilter K 510. Für die Selektivanregung wurde wiederum der Filter KP 500 mit dem Sperrfilter K 510 kombiniert. Bei diesem Gerät wurde ein automatische Belichtung mit Punkt- und Integralmessung benutzt, und die geeignetste Empfindlichkeitseinstellung (DIN, ASA), die im Endeffekt auch der Belichtungszeit entsprach, für die entsprechenden Filmsorten getestet.

3.6.3 Filmmaterial

Für die photographischen Aufnahmen wurden Schwarz-Weiß-Filme und Farbfilme benutzt. Als Schwarz-Weiß-Film wurden ILFORD Pan-F-Film mit einer Empfindlichkeit von 18 DIN und KODAK Tri-X-Film mit einer Empfindlichkeit von 27 DIN gewählt. Die Filme wurden teils hart, teils weich entwickelt. Für die

Hartentwicklung wurde Metinol 1:8, für die Weichentwicklung Rodinal 1:25 benutzt. Die Fixierung erfolgte durch Agfa Fixiersalz.

Als Farbfilme wurden folgende Tageslichtfilme herangezogen:
KODAK Ektachrome High Speed, Empfindlichkeit 22 DIN,
AGFA Gevaert CT, Empfindlichkeit 18 DIN,
Agfachrome professional 50 S, Empfindlichkeit 18 DIN,
AGFA nega, Empfindlichkeit 18 DIN,
FUJICHROME R 100, Empfindlichkeit 21 DIN,
FUJICOLOR N 100, Empfindlichkeit 21 DIN.

4 Ergebnisse

4.1 Kryostatschnitte tiefgefrorener Augen

4.1.1 Sofortbeobachtung

Bei den sofort nach dem Schneiden im Kryostat unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachteten Schnitten konnte bei Auflichtanregung unter Kombination Erregerfilter BG 12 und Sperrfilter 50 folgendes festgestellt werden: Die Schnitte des Kontrollauges (ohne Fluoresceingehalt) von maximal 15 µ Dicke zeigten keine wahrnehmbare Primärfluoreszenz der Gewebe. Man konnte die Netzhautschichten nicht voneinander unterscheiden. Die inneren Netzhautschichten hoben sich undeutlich vom Untergrund ab. Bei den albinotischen Ratten konnte man auch im abgedunkelten Raum und nach längerer Akkommodation keine strukturellen Einzelheiten beschreiben. In den Schnitten der pigmentierten Ratten konnten die Aderhaut und Regenbogenhaut infolge ihres Pigmentgehaltes als dunkle Abschnitte erkannt werden. Durch die Filterkombination UG 1 (Excitationsfilter) und Sperrfilter 41 konnte in diesem Fall praktisch gar nichts erkannt werden. Durch die Selektivanregung konnte man die Konturen etwas deutlicher erkennen als mit dem BG 12 Filter, jedoch war die photographische Dokumentation auch in diesem Fall nicht möglich.

Die 15 µ starken Schnitte (Kryostatschnitte) der 60 Sekunden nach i.v. Fluoresceininjektion enukleierten Augen zeigten,

wenn sie im Fluoreszenzmikroskop unter Auflicht sofort beobachtet wurden, eine allgemeine Überschwemmung der Gewebe mit Fluorescein, so daß alle Gewebeschichten stark und gleichmäßig fluoreszierten, während Aderhaut und Regenbogenhaut je einen dunklen Bezirk bildeten, wie es aus der Abbildung 1 hervorgeht.

Abb. 1: Auge einer pigmentierten Ratte. 60" nach i.v. Fluorescein-Na. Kryostatschnitt 15 µ, Blaulichtanregung. Sklera und Netzhaut überschwemmt von Farbstoff, keine Lokalisation in der Aderhaut. (x63)

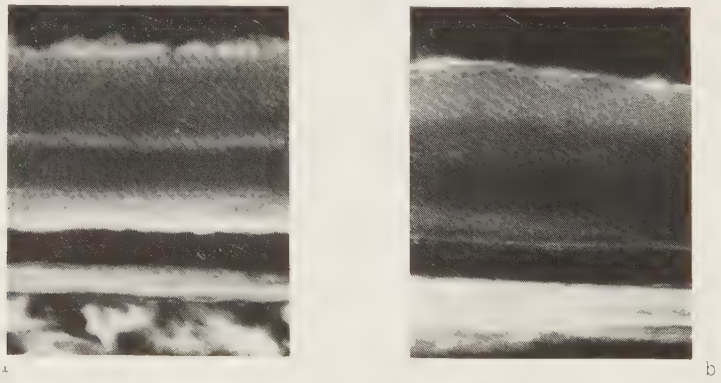
Es spielte keine Rolle, wie die Schnitte auf den Objektträgern angebracht wurden. Bei sofortiger Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop waren die Gewebe in jedem Fall von Fluorescein-Na überschwemmt.

Mit der Filterkombination UG 1 + 41 sahen die bereits mit Fluorescein-Natrium überschwemmten Gewebe aus, als ob sie eine sehr starke und regelmäßige Eigenfluoreszenz besäßen.

4.1.2 Auf Objektträgern lyophilisierte Schnitte

Makroskopisch sahen die im Vakuum getrockneten Schnitte auf den Objektträgern wie rauhe, matt-weiße Flächen aus, in denen sich die Linse durch ihre milchig weiße Farbe abhob.

Die 15 µ starken Schnitte ohne Fluorescein - ganz gleich wie und ob sie vor der Trocknung auf den Objektträgern fixiert worden waren - zeigten jetzt eine gut erkennbare Eigenfluoreszenz der Gewebe. Am stärksten leuchtete in der Netzhaut die Sehzellenschicht. Mit der Blaulichtanregung hob sich die Sehzellenschicht grünlich-gelb von den anderen Netzhautschichten ab, welche sich nun auch untereinander differenzieren ließen. Die Pigmentepithelschicht leuchtete stark orange-gelb. Unter der Violettlichtanregung erkannte man die Eigenfluoreszenz dieser Gewebe hell blau leuchtend (Abb. 2).



a b

Abb. 2: Pigmentierte Ratte, Kontrollauge.
Lyophilisierte Kryostatschnitte 15 µ.
a: Aufnahme unter Blaulichtanregung (x63)
b: Aufnahme unter Violettlichtanregung (x63)

Die getrockneten Kryostatschnitte der Augen, die Fluorescein enthielten, verhielten sich je nach der Art wie sie vor der Trocknung auf den Objektträgern fixiert worden waren unterschiedlich: Die Schnitte, die auf nicht vorgekühlten Objektträgern angebracht worden waren, zeigten unter dem Fluoreszenzmikroskop bei Blaulichtanregung eine Überschwemmung aller Gewebe mit Fluorescein, wobei eine Summation der Eigenfluoreszenz mit der Sekundärfluoreszenz hervortrat, wie in Abbildung 3 erkennbar. Man konnte nur die Fluoreszenz aber kein Fluorescein lokalisieren.

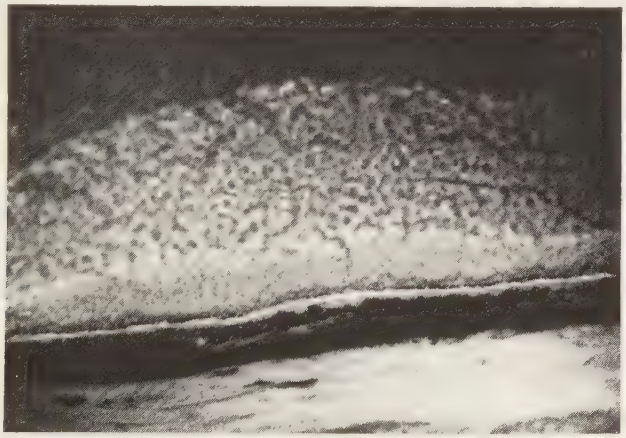


Abb. 3: Pigmentiertes Rattenauge. 60" nach i.v. Na-Fluorescein. Kryostatschnitt 15 µ, KP 500 + K 510. Überschwemmung des Schnittes mit Farbstoff. Keine Lokalisation in der Chorioidea. (x63)

Diejenigen Schnitte, die durch Kontakt mit der Fingerkuppe unter dem Schnitt auf den sich im Kryostat befindenden Objektträgern fixiert worden waren, zeigten nach der Lyophilisierung

eine ungleichmäßige Überschwemmung der Gewebe mit Farbstoff und nur Spuren von Fluorescein in den Aderhautgefäßen. In den Netzhautkapillaren konnte man kein Fluorescein mehr lokalisieren; dadurch waren die Kapillaren selbst schwer zu unterscheiden. Abbildung 4 zeigt diese ungleichmäßige Überschwemmung durch die Diffusion des Fluoresceins.

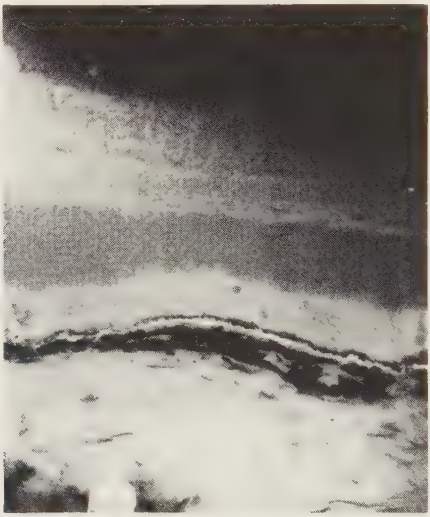


Abb. 4: Pigmentiertes Rattenauge. 60" nach i.v. Fluorescein-Na. Kryostatschnitt 15 µ, KP 500 + K 510. Überschwemmung der Gewebe und wenig Farbstoff in den großen Aderhautgefäßen. (x63)

Die Schnitte, die ohne Fixierung auf die vorgekühlten Objektträger gebracht und nach der Lyophilisierung mittels Xylol auf den Objektträgern gestreckt und abgedeckt worden waren, verhielten sich unter dem Fluoreszenzmikroskop mit Auflicht folgendermaßen: Sowohl unter der Filterkombination für Blau-

Lichtanregung als auch unter der Kombination für Violettanregung konnte man das Fluorescein in den Aderhautgefäßen gut lokalisieren. Die Netzhautgefäße und Kapillaren waren durch das in ihnen befindliche Fluorescein gut sichtbar. Die Eigenfluoreszenz der Gewebe war schwach ausgebildet. Auf den inneren Netzhautschichten lag jedoch teilweise ein zarter Fluoresceinschleier, möglicherweise durch den Glaskörper bedingt (Abb.5).

Abb. 5: Katzenauge, 60" nach i.v. Fluorescein-Na. Kryostatschnitt 10 µ unter Blaulichtanregung - BG 12 + 50. (x25)

4.2 Paraffinschnitte lyophilisierter Augengewebe

Wie im ersten Abschnitt beschrieben, wird bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen von Augengeweben fluorescein-behandelter Tiere eine Technik benötigt, die der hohen Diffusibilität des Fluorescein-Farbstoffs Rechnung trägt. Eine Lokalisierung des Farbstoffs nach der intravenösen Applikation ist mit einiger Sicherheit nur möglich, wenn eine weitere Diffusion nach der Enukleation des Auges verhindert wird. Dies ist möglich, indem man das enukleierte Auge schnell tiefgefriert und anschließend gefriertrocknet, wodurch die flüssige Phase bei der histologischen Aufarbeitung des Gewebes und damit die Diffusion des Farbstoffs verhindert wird.

4.2.1 Vakuumtrocknung bei -80° C

Die makroskopischen Befunde bei der Vakuumtrocknung mit -80° C und einem Enddruckwert von 0,01 = 10^{-2} Torr über eine Dauer von 68 - 144 Stunden (vgl. Ergebnistabelle, Zeile 1-4), wurden durch Zugabe bzw. mehrmaliges Erneuern von Phosphorpenthoxyd (P_2O_5) beeinflußt. Wenn ohne P_2O_5 gearbeitet wurde oder wenn das P_2O_5 sich von Anfang an unter der Vakuumglocke befand, hatten die Linsen eine undurchsichtige milchig-weiße Farbe und blieben erhalten (Abb.6). Die Netzhaut hatte eine opak-weiße Farbe (Abb.7).

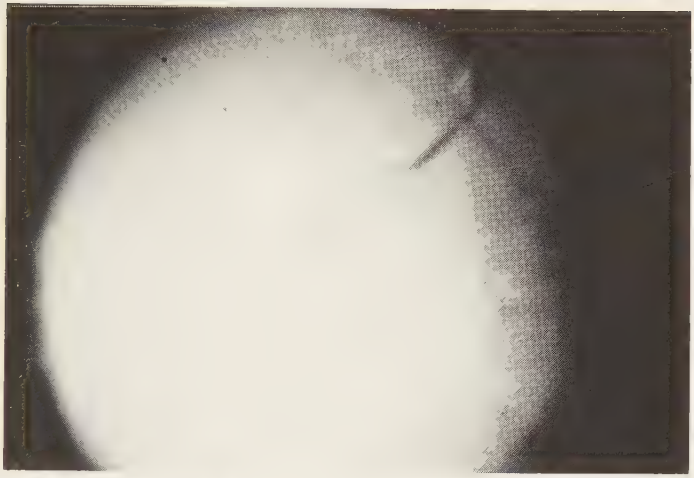


Abb. 6: Linse aus einem getrockneten Rattenauge, [illegible] Stunden ohne P_2O_5-Wechsel (x25)

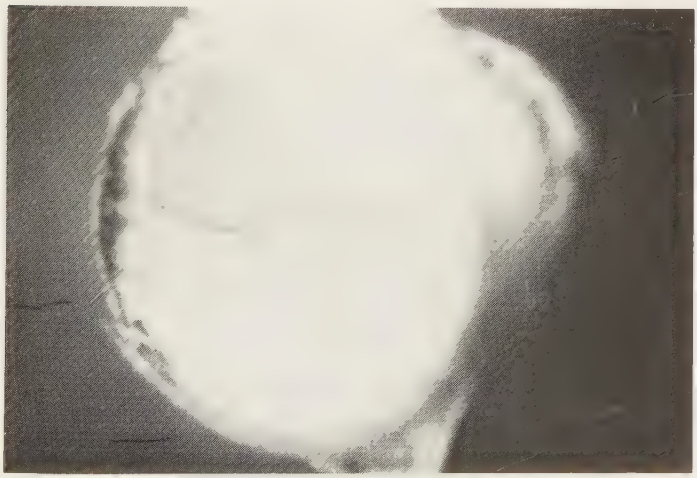


Abb. 7: Lyophilisiertes Auge einer pigmentierten Ratte. Hinterer Abschnitt (x12)

Bei mehrmaligem Erneuern von P_2O_5 zeigt die Linse einen tiefen Sprung. Nach Entfernen der Linse konnte man den wolkenartig getrockneten Glaskörper wahrnehmen. Nach Herausnahme des Glaskörpers sah man, daß sich die Netzhaut opak-weiß verfärbt hatte und viele Sprünge aufwies.

Die fluoreszenzmikroskopische Beobachtung der 6 - 15 µ dikken Schnitte ergab eine gut erhaltene Struktur. Die Augen wurden in Paraplast innerhalb 35 - 65 Minuten bei 50 bis 55° C eingebettet, unter Vakuum, dessen Enddruck 0,03 Torr betrug; die Präparate wurden meistens innerhalb 48 Stunden, jedoch nie nach dem 7. Tag geschnitten.

Bei den Kontrollaugen erkannte man mit der Filterkombination KP 500 + K 510 die schwache, grünlich-gelbe Eigenfluoreszenz (Abb.8). Mit der Filterkombination UG 1 + 41 leuchtete die Eigenfluoreszenz in schwachen Blautönen. Bei den Schnitten der Kontrollaugen mit zersprungener Netzhaut sah man am Rand

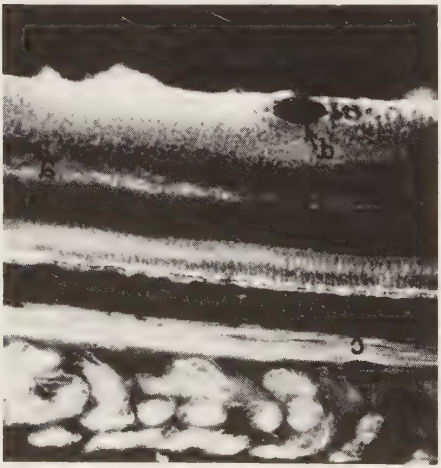


Abb. 8:
Kontrollauge einer pigmentierten Ratte.
a) Netzhaut, b) Aderhaut, c) Sklera, d) Netzhautgefäß (x26,3)

der Sprünge eine viel stärkere Eigenfluoreszenz (Sprungkantenfluoreszenz).

Bei den Augen aus den Fluorescein-Na-Versuchen war die Eigenfluoreszenz der Gewebe unter beiden Filterkombinationen schwach. Die Sekundärfluoreszenz leuchtete stark in den Gefäßen und Kapillaren, besonders unter Blaulichtanregung. Unter Violettanregung war diese Sekundärfluoreszenz etwas gedämpfter.

c. . Vakuumtrocknung bei -40° C

Die Augen wurden bei konstant gehaltenen -40° C oder bei stufenweisem Anstieg der Temperatur, in jedem Fall immer im Vakuum bis zu 0,01 Torr lyophilisiert. Die Trocknungszeiten lagen zwischen 16 und 112 Stunden mit und ohne P_2O_5-Zugabe. Phosphorpenthoxyd wurde am Anfang zugegeben und beibehalten oder mehrmals gewechselt (vgl. Ergebnistabelle, Zeile 5-12). Nach beendeter Lyophilisierung konnte makroskopisch festgestellt werden, daß die Linse intakt geblieben, jedoch undurchsichtig und milchig-weiß geworden war. Nur bei den Augen, bei denen das P_2O_5 gewechselt worden war, zeigte sie Spaltenbildung (Abb.9).

Nach dem Entfernen der Linse konnte man bei allen Augen den Glaskörper wolkenartig weiß erkennen. Die Netzhaut erschien nach dem Entfernen des Glaskörpers opak-weiß. Bei den Augen, die unter öfterem Wechseln des P_2O_5 lyophilisiert worden waren, wies die Netzhaut zahlreiche Sprünge auf.

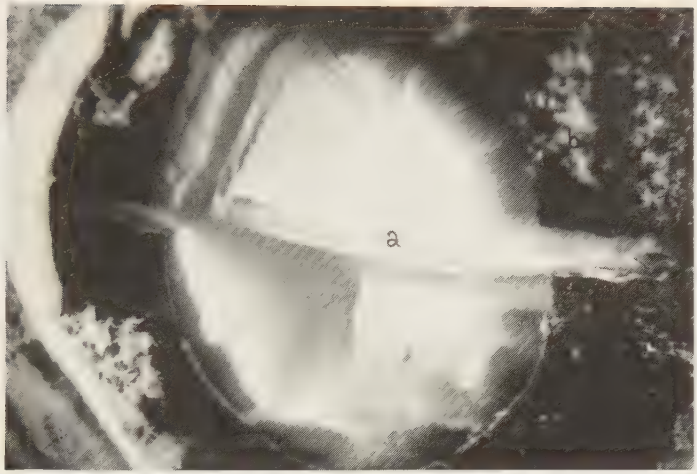


Abb. 1: Lyophilisiertes Kaninchenauge.
Nach gefrorener Trocknung wurde die Hornhaut entfernt.
a vertrocknete, zersprungene Linse
b regenerierte Linse x 2

Nach dem normalen Einbetten der Augen ohne Fluoreszein-Na bei 50 bis 55° C, innerhalb von 40 bis 65 Minuten und im Vakuum bis zu 0,03 Torr, wurden Schnitte zwischen 6 und 30 µ hergestellt und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Dabei zeigte es sich, daß frisch hergestellte Schnitte dieser Kontrollaugen, bis zu 15 µ Dicke, bei Verwendung des KP 5 Selektivfilters, eine sehr schwache Eigenfluoreszenz aufwiesen. Unter dem UG 1-Erregerfilter (Violettanregung) war die Eigenfluoreszenz noch schwerer zu erkennen. Die Schnitte von 20 - 30 µ zeigten unter beiden Filterkombinationen eine stärkere Eigenfluoreszenz.

Von den Augen, die Fluorescein-Na enthielten, zeigten die Schnitte unter Blaulichtanregung eine schwache Fluoreszenz der

Gewebe und eine kräftig leuchtende Sekundärfluoreszenz des Farbstoffs im Bereich der Gefäße und Kapillaren. Diese Sekundärfluoreszenz erschien etwas schwächer unter Violettanregung. Die Risse der Netzhaut zeigten eine stark erhöhte Kantenfluoreszenz, welche sich meistens als Primärfluoreszenz identifizieren ließ, besonders bei vergleichender Beobachtung ein und derselben Stelle unter den Filterkombinationen: BG 12 + 50, UG 1 + 41, BG 12 + K 510, UG 1 + K 430 und KP 500 + K 510. Es konnten auch Risse beobachtet werden, die bis zur Aderhaut, manchmal auch bis zur Lederhaut reichten, an deren Kanten bei derselben vergleichenden Beobachtung außer der erhöhten Kanteneigenfluoreszenz eine schwache Farbstoff-Fluoreszenz festgestellt werden konnte (Abb.10/11). Die Struktur der Gewebe war gut erhalten, so daß bei Schnitten bis zu 15 µ viele strukturelle Einzelheiten erkennbar waren (Abb.12).

Abb. 10: Kaninchenauge. Paraffinschnitt 12 µ.
Netzhautriß bis in die Aderhaut.
a) Netzhaut, b) Aderhaut (x26,3)

Abb. 11: Rattenauge. Paraffinschnitt 10 µ.
Netzhautzentrale bis zur Sklera.
a) Netzhaut, b) Aderhaut, c) Lederhaut
(x63)

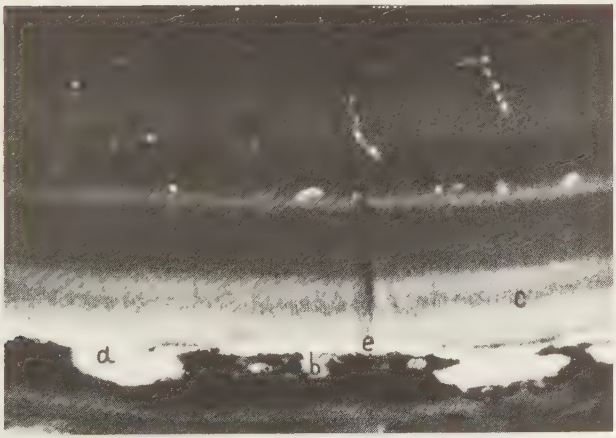


Abb. 12: Pigmentiertes Rattenauge, 60 " nach i.v. Farbstoffinjektion. Paraffinschnitt 10 µ.
a) Sklera, b) Chorioidea, c) Retina,
d) Chorioideagefäße, e) Choriokapillaren,
f) Retinakapillaren (x63)

1. .[illegible] Vakuumtrocknung bei -20° C

Die Augengewebe wurden entweder bei -20° C konstanter Temperatur getrocknet, oder unter stufenweisem Anstieg der Temperatur immer so lange, bis der Druck zwischen 0,03 und 0,1 Torr lag, wofür 8 - 72 Stunden benötigt wurden, und zwar sowohl ohne P_2O_5-Zusatz als auch mit P_2O_5-Zusatz und unter Wechsel von P_2O_5 (vgl. Ergebnistabelle, Zeile 13-19).

Makroskopisch konnte man eine undurchsichtige, milchigweiße Linse feststellen, welche nur bei Augen Spaltbildungen zeigte, bei denen ein häufigerer P_2O_5-Wechsel stattgefunden hatte. Der Glaskörper imponierte bei allen Augen wolkenartig weiß (Abb.13). Die Netzhaut sah opak-weiß aus und zeigte viele Spaltenbildungen bei solchen Augen, die unter Wechseln von P_2O_5 lyophilisiert wurden.

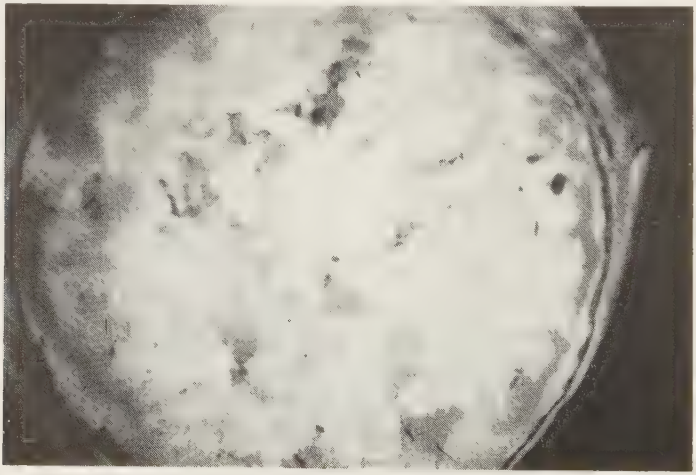
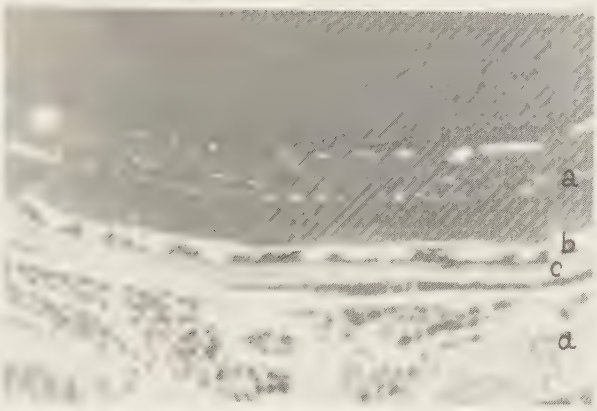


Abb. 13: Lyophilisiertes Rattenauge. Die vorderen Abschnitte des Auges wurden nach beendeter Trocknung entfernt und die Linse sorgfältig entnommen, um den wolkenartigen Glaskörper zu erhalten. (x12)



. . .: Pigmentierte Ratte; Auge mit Fluorescein-Na.
a) Netzhaut, b) Aderhaut, c) Lederhaut, d) Bindegewebe
Filterkombination KP 500 + K 510 (x25)

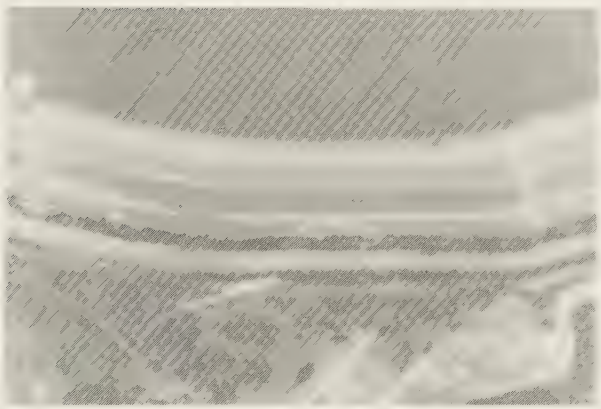


Abb. 15: Dieselbe Aufnahme wie auf Abbildung 14 jedoch unter Violettlichtanregung (UG 1 + 11). (x25)

Nach normalem Einbettungsverfahren (50-55° C, 35-60 Minuten, 0,03 Torr) wurden innerhalb von 1 - 3 Tagen Schnitte von 6 - 15 µ hergestellt, die unter dem Fluoreszenzmikroskop folgendes zeigten: Die Struktur der Gewebe war gut erhalten, die Gewebe zeigten eine schwache Eigenfluoreszenz bei den Kontrollaugen unter den Filtern UG 1 + 41 und etwas stärker hervortretend unter der Filterkombination BG 12 + 50, KP 500 + K 510. An den Kanten der Sprungbildungen stellte sich eine sehr viel stärkere Eigenfluoreszenz dar.

Die Schnitte der Augen, die Fluorescein-Na enthielten, zeigten unter Blaulichtanregung eine starke Sekundärfluoreszenz, die unter Violettanregung etwas gedämpfter war (Abb.14/15).

4.2.4 Vakuumgetrocknete Augengewebe

Die Augen wurden nach Ausschaltung der Kühlung im ansteigenden Vakuum bis zu 0,01 = 10^{-1} Torr getrocknet. Der Trocknungsprozeß dauerte 4 - 48 Stunden sowohl ohne P_2O_5-Zusatz als auch mit P_2O_5-Zusatz, oder mit öfterem, 2 - 3mal erfolgendem P_2O_5-Wechsel (vgl. Ergebnistabelle, Zeile 20+21).

Makroskopisch ließ sich nach beendeter Lyophilisation folgendes erkennen: Undurchsichtige, milchig-weiße Linse, die nur bei Augen mit Erneuern des P_2O_5 während des Trocknens gespalten war. Der Glaskörper erschien wolkenartig weiß (Abb.16). Die opak-weiße Netzhaut war bei den unter P_2O_5-Wechsel lyophi-

Abb. 16: Formalinfixiertes Rattenauge nach Entfernung des vorderen Abschnitts.
a) Linse stark gespalten, b) Glaskörper (x12,

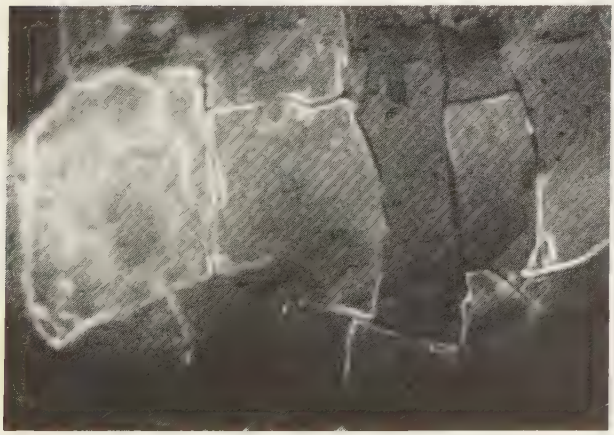


Abb. 17: Mehrfach gespaltene Netzhaut mit kräftigem Anstieg der Autofluoreszenz an den Sprungkanten. (x26,3,

Abb. 18: Hinterer Pol eines vakuumgetrockneten Rattenauges.
a) Papille, b) Netzhautgefäße (x25)

lisierten Augengeweben (Abb.17) mehrfach gespalten, sonst fast ohne Risse (Abb.18).

Nach Einbettung (50-55° C, 40-65 Minuten, 0,03 Torr) wurden Schnitte zwischen 6 - 15 µ hergestellt, die unter dem Fluoreszenzmikroskop folgende Beobachtung ergaben: Strukturmäßig sind Einzelheiten gut zu erkennen. Bei den Kontrollaugen ohne Fluorescein konnte unter den Filterkombinationen UG 1 + 41 und UG 1 + K 430 eine schwache Eigenfluoreszenz der Gewebe erkannt werden. Unter den Filterkombinationen KP 500 + K 510 und BG 12 + K 510 erkannte man dieselbe schwache Eigenfluoreszenz. Die Schnitte der Augen mit Fluorescein zeigten dieselbe Eigenfluoreszenz und Sekundärfluoreszenz bei Blaulicht- und Violettananregung wie bei den [illegible]verfahren (Abb.19/20).

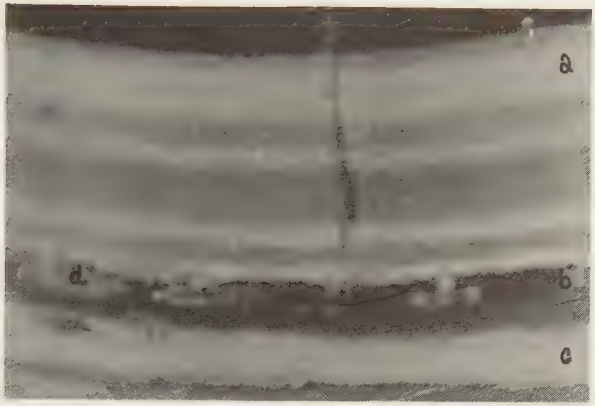


Abb. 1 : [illegible]
µ unter [illegible]
[illegible]

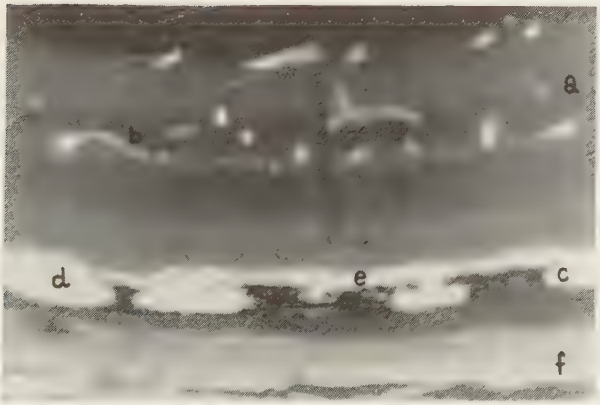


Abb. 20: Dasselbe Auge wie in Abbildung 1[illegible]. Paraffinschnitt 10 µ unter Blaulichtanre[illegible]
K 510.
a) Netzhaut, b) Netzhautkapillaren, c) Aderhaut, d) große Aderhautgefäße, e) Choriokapillaren, f) Lederhaut. (x65,

4.2.5 Abwandlung des Trocknungsverfahrens

Die Lyophilisierung bei -40° C wurde je nach Gewebemenge bei entsprechenden Vakuumwerten von 0,1 bis 0,05 Torr unterbrochen, oder verlängert bis das Vakuum 10^{-3} = 0,001 Torr erreichte (72 Stunden). Vergleiche Ergebnistabelle Zeile 22 und 3.

Nach 4 Stunden Gefriertrocknung war die Linse noch durchsichtig, der Glaskörper gelatineartig und die Netzhaut rosagrau gefärbt. Nach 10 Stunden Gefriertrocknung war die Linse

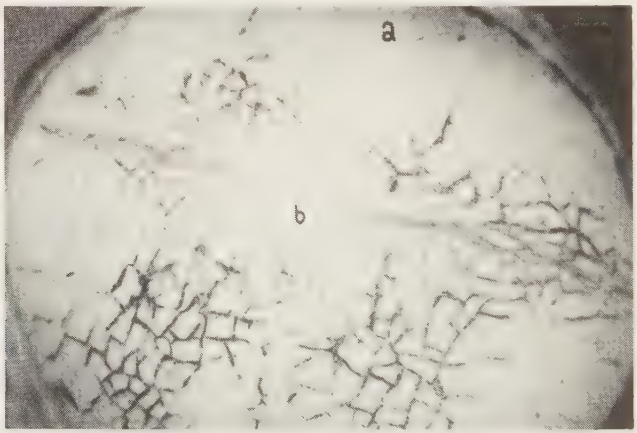


Abb. 21: Übertrockenes Kaninchenauge
a) Netzhaut, b) Papille (x25)

teilweise undurchsichtig, milchig-weiß und gefleckt, der Glaskörper zeigte sich als grau-weißes dünnes Häutchen verändert und die Netzhaut war weiß-rosa-grau gefleckt.

...ch 72 Stunden Gefriertrocknung war die Linse undurchsich-
..., milchig-weiß und brüchig, der Glaskörper glich jetzt wei-
...er ...aub und die Netzhaut war opak-weiß und mit Spaltbildun-
...versehen. Insgesamt glich sie rissig gewordener, trockener
...ge. Es bestand stellenweise eine Netzhautabhebung von der
...

...ese Augen bzw. Augenteile wurden bei 55 - 60° C 40 Minu-
... eingebettet, wobei 0,03 Torr erreicht wurden. Die
...tte von 6 - 15 µ ergaben unter dem Fluoreszenzmikroskop
...: Be... den Augen mit 4 - 10 Stunden Trocknungs-
...waren die Gewebsschichten teilweise verzogen (Abb.22).
...en 4 Stunden lang getrockneten Kontrollaugen war keine
... fluoreszenz zu erkennen. Bei den Augen, die Fluoresceinthielten, bestand bei gleicher Trocknungszeit eine starke
...sion des Farbstoffs (Abb.22). Nach 10 Stunden Gefrier-
...

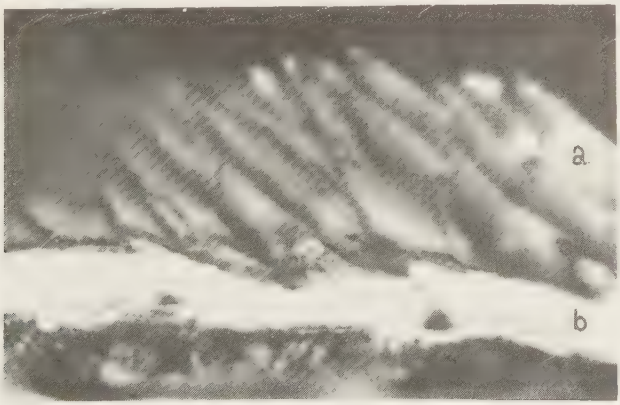


Abb. 22: Kaninchenauge, 60" nach i.v. Fluorescein-Na. Ungenügend getrocknetes Gewebe - Farbstoffüberschwemmung.
a) Netzhaut, b) Aderhaut

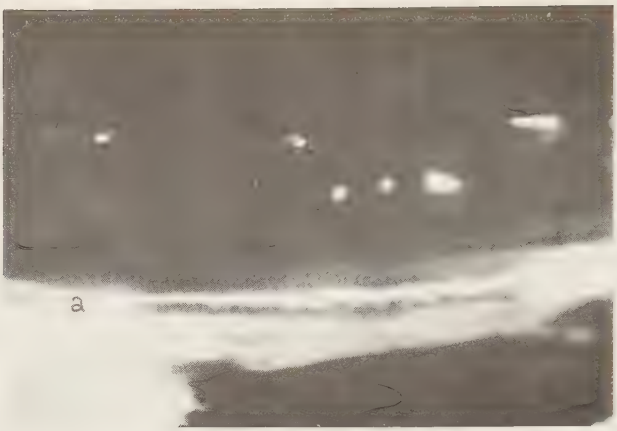


Abb. 23: Rattenauge, 10 µ Schnitt.
a) Netzhautkapillaren leicht überschwemmt
(x63)

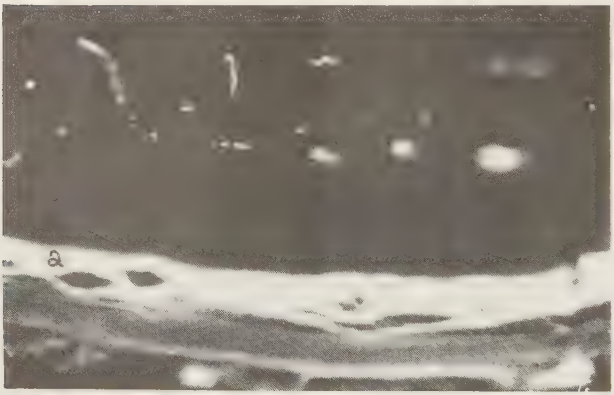


Abb. 24: Rattenauge, 10 µ Schnitt.
a) Farbstoff nicht lokalisiert in den Aderhautgefäßen (x63)

Blaulichanregung kaum, unter Violettlichtanregung gar nicht wahrnehmbar. Bei den Augen mit Fluorescein zeigten die Schnitte nach 10 Stunden Gefriertrocknung dieselbe sehr zarte Eigen-

fluoreszenz und eine leuchtende Sekundärfluoreszenz. Die Aderhaut erschien vom Farbstoff vollständig eingenommen. Einzelne Aderhautgefäße waren nicht lokalisierbar. In den Netzhautkapillaren war ebenfalls ein starker Farbstoffgehalt sichtbar [illegible].

Die Schnitte der Augen nach 72 Stunden Gefriertrocknung erwiesen keine gute Voraussetzung für die Untersuchung, da das Gewebe zu viele Sprünge, Abhebungen und Risse zeigte (Abb.25). Die Schnitte der Kontrollaugen zeigten eine sehr starke Eigenfluoreszenz der verschiedenen Gewebsschichten. Das gleiche gilt für Schnitte von nur 6 - 8 µ Dicke bei beiden Erregungsarten, sowohl bei Blaulicht als auch bei Violettlicht (Abb.26). Die Eigenfluoreszenz war so kräftig, daß die Sekundärfluoreszenz bei den Augen mit Fluorescein kaum durchzudringen vermochte, obwohl dieselbe Fluoresceindosierung eingehalten wurde und die Enukleationszeiten denen der anderen Versuche entsprachen [illegible].

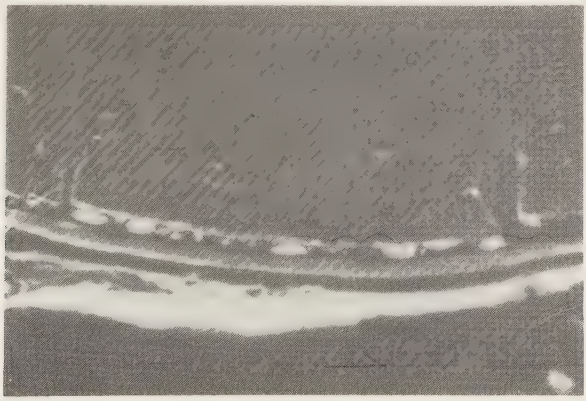


Abb. 25: Pigmentiertes Rattenauge. 45" nach i.v. Fluorescein-Na (x17,3)

Abb. 26: Pigmentierte Ratte, Kontrollauge.
8 µ Schnitt, BG 12 + 50 (x25)

Abb. 27: Pigmentiertes Rattenauge. 45" nach Farbstoffinjektion. 8 µ Schnitt, BG 12 + 50
(x17,3)

4.[illegible].6 Veränderte Einbettung

[illegible] Zeitfaktor

[illegible] 1 bei -40° C, für die Dauer von 26 Stunden unter 0,03 [illegible] philisierte Augen wurden so lange bei 55 - 60° C, näm- [illegible] Minuten lang eingebettet, bis das Vakuum auf 0,01 Torr [illegible] gl. Ergebnistabelle, Zeile 26). Folgende Ergebnisse [illegible] sich unter dem Fluoreszenzmikroskop bei frischen Schnitten von 6 - 15 μ: Eine gut erhaltene Gewebestruktur, eine kaum stärkere Eigenfluoreszenz der Kontrollaugen und eine normale Fluorescein-Fluoreszenz bei den Fluoresceinhaltigen Augen (Abb.28).

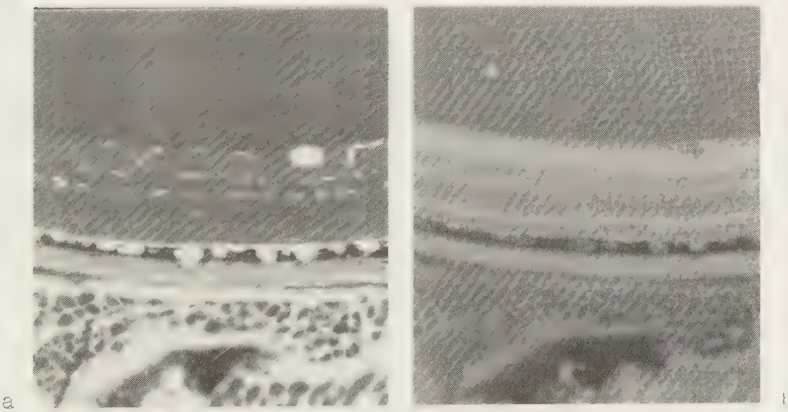


Abb. 28: Pigmentiertes Rattenauge. 60" nach Farbstoffinjektion. Derselbe 12 μ Paraffinschnitt
a) unter Blaulichtanregung KP + K 510 und
b) unter Violettlichtanregung UG 1 + 41
(x17,3)

4.2.6.2 Temperaturfaktor

Andere Augen wurden nach ebenfalls normalem Trocknungsverfahren (vgl. Ergebnistabelle, Zeile 25) eingebettet, und zwar 30 Minuten lang bis zu einem Druck von 0,03 Torr, zum Teil bei -70° C, zum anderen Teil bei -80° C (vgl. Ergebnistabelle, Zeile 7/26).

Die Schnitte von 10 µ zeigten nach der Einbettung bei -70° C eine noch erhaltene Gewebestruktur. Die Kontrollaugen wiesen unter den Filterkombinationen für Blaulichtanregung und für Violettlichtanregung eine Zunahme der Eigenfluoreszenz auf (Abb.29/30). Die Augen mit Fluorescein zeigten unter beiden Filterkombinationen dieselbe erhöhte Eigenfluoreszenz.

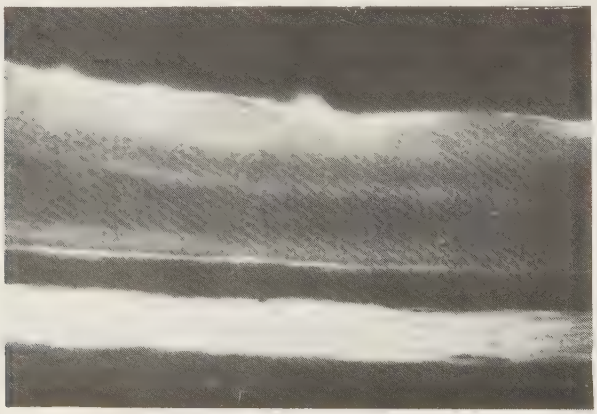


Abb. 29: Pigmentierte Ratte, Kontrollauge. Paraffinschnitt 10 µ. Filterkombination UG 1 + 41 (x25)

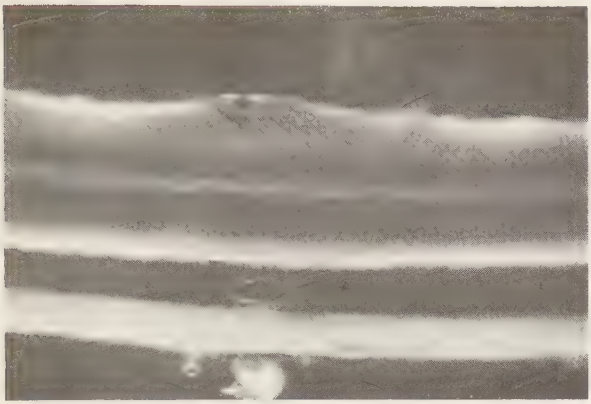


Abb. : e Ratte, Kontrollau .
µ.
(x25)

zeigten die Schnitte ein

. wodurch die

.

Abb. 31: Katzenauge. Paraffinschnitt 12 µ.
a) Netzhaut, b) Tapetum, c) Aderhaut,
d) Lederhaut (x2)

4.2.7 Alter der Schnitte und der Präparate

Die Schnitte zeigten schon nach 1 - 2 Tagen einen Anstieg der Eigenfluoreszenz. Nach 2 - 3 Tagen war der Anstieg so stark, daß unter Blaulichtanregung die Schnitte hell gelblichgrün wirkten, wobei der Gelbton stark in den Vordergrund trat. Bei Violettlichtanregung wirkte das Blau der Gewebe immer leuchtender und heller, so daß die grüne Fluoreszenz des Fluoresceins abgeschwächt erschien. Nach 7 Tagen trat außerdem eine strukturelle Desintegration der Gewebe ein. Die Zunahme der Eigenfluoreszenz in den Präparaten erfolgte etwas langsamer. Sie war jedoch bereits nach 7 - 10 Tagen - je nach Lagerung - wahrnehmbar. Strukturmäßig blieben die Gewebe gut erhalten (Abb. 32).

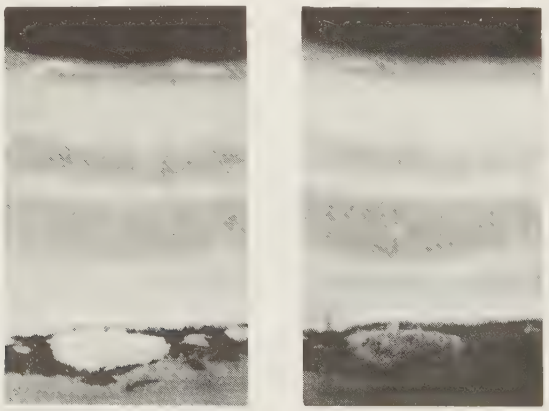


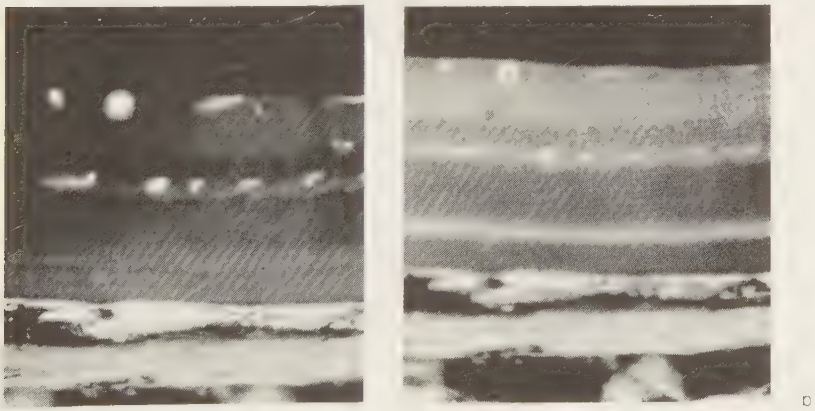
Abb. 32: Pigmentiertes Rattenauge. 60" nach i.v. Fluorescein-Na enukleiert. Ein und derselbe 12 µ Paraffinschnitt, 4 Tage alt: a) KP 500 + K 510, b) UG 1 + 41 (x63)

4.7 Filmmaterial

Es wurden hauptsächlich Tageslichtfilme benutzt, wobei die Typen ILFORD, KODAK, AGFA, FUJI mit Empfindlichkeiten zwischen [illegible] DIN herangezogen wurden. Die Belichtungszeiten lagen zwischen 5 Sekunden und 10 Minuten unter Blaulichtanregung und [illegible] Weißanregung.

Die Abbildungen 33 bis 39 zeigen die unterschiedlichen Farbtöne, da es sich jeweils um ein und dasselbe Auge handelt, wo die Fluorescein-Na-Konzentration und Menge, die Enukleationszeit sowie das Trocknungs- und Einbettungsverfahren konstant gehalten wurden.

Diese Abbildungen sollen auch als Beispiele zu Vergleichszwecken hinsichtlich ihrer Vor- und Nachteile zur Diskussion [illegible].



a b

Abb. 33: Pigmentiertes Rattenauge. 45" nach i.v. Farbstoffinjektion. Paraffinschnitt 10 µ.
a) KP 500 + K 510, b) UG 1 + 41. Farbabzüge nach KODAK Ektachrome High Speed - 22 DIN (x65,7)

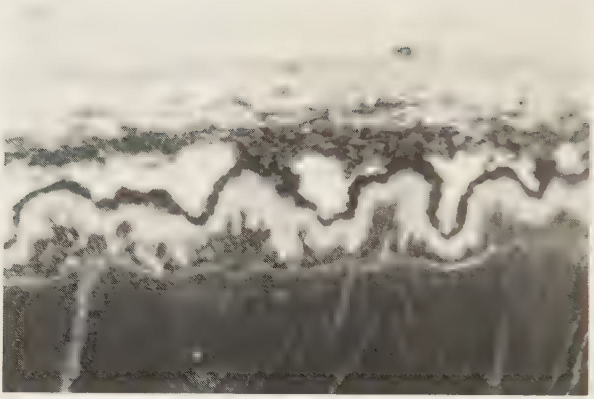


Abb. [illegible]: Dasselbe Auge wie in Abbildung [illegible].
Ciliarkörper unter KF 500 + K 510 auf
KODAK Ektachrome High Speed (x65)

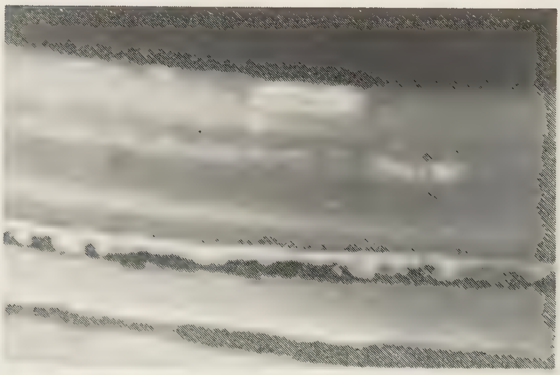


Abb. [illegible]: Dasselbe Präparat wie in Abbildung [illegible].
Filterkombination UG [illegible] + 41. Farbabzug
nach AGFA nega. 18 DIN (x65)

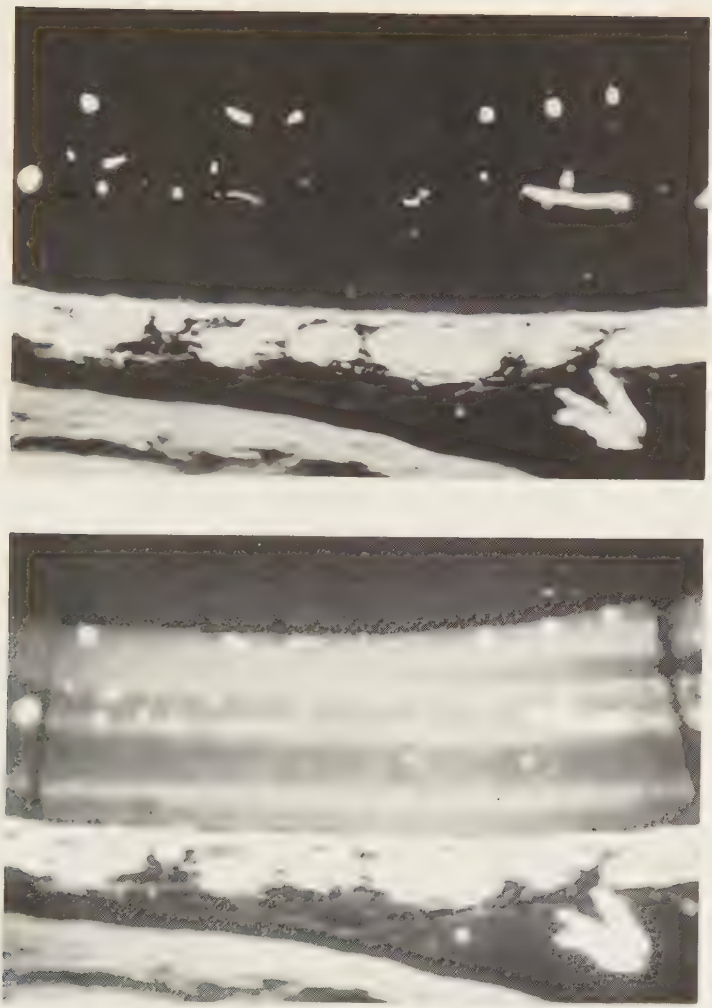


Abb. 34: Dasselbe Präparat wie Abbildung 33. Filterkombination a) KP 500 + K 510, b) UG 1 + 41. Beide Aufnahmen auf demselben Film AGFA Gevaert CT, 18 DIN (x65,7)

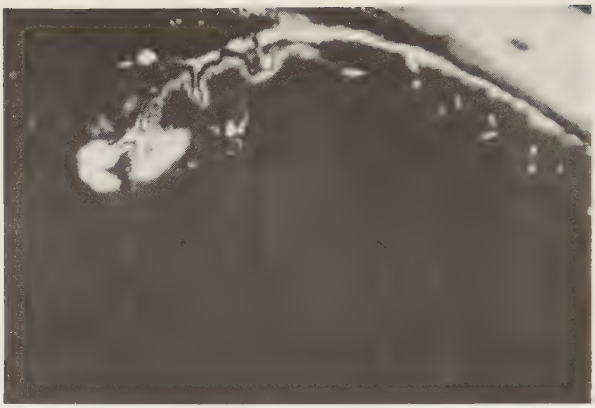


Abb. 37: Dasselbe Präparat wie Abbildung 36. Iris und periphere Netzhaut unter der Filterkombination KP 500 + K 510 auf FUJICHROME R 100, 21 DIN (x25)

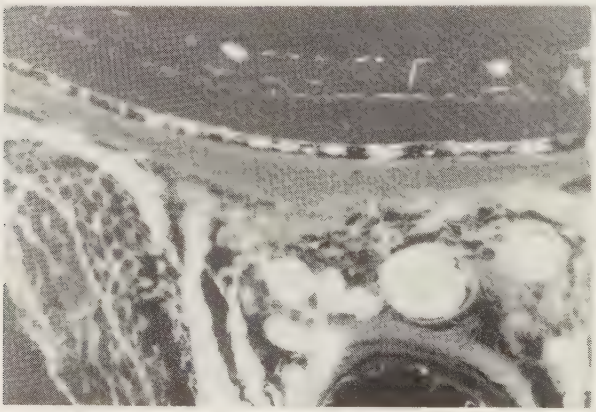


Abb. 38: Derselbe Schnitt wie vorher. Papillargegend unter Filterkombination KP 500 + K 510 auf FUJICOLOR N 100, 21 DIN (x25)

b

: Derselbe Schnitt wie Abbildung 36.
Filterkombination a) KP 500 + K 510,
b) UG 1 + 41. Beide Aufnahmen auf FUJICOLOR
N 100, 21 DIN (x65,7)

4.4 Ergebnistabelle

Nr.	Tier	[illegible]	VAKUUM Beginn Temp °C	VAKUUM Beginn Zeit Std	VAKUUM Trocknung Temp °C	VAKUUM Trocknung Zeit Std	VAKUUM Ende Temp °C	VAKUUM Ende Zeit Std	P_2O_5	End-druck Torr	Gesamtzeit Stunden	MAKROSKOPISCHE BEFUNDE Linse	MAKROSKOPISCHE BEFUNDE Glaskörper	MAKROSKOPISCHE BEFUNDE Netzhaut	EINBETTUNG Temp °C	EINBETTUNG Zeit	EINBETTUNG Enddruck Torr	[illegible]	[illegible]	FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE [illegible] Struktur	[illegible]	[illegible]
1	Ratte		-?	?			?0	3	mit	0,03-0,01	72	milchweiß	wolkenartig	opak weiß	?-?	?	[illegible]	?-15	?	erhalten	[illegible]	leuchtend
2	"	"	"	71			"	"	ohne	"	74	"	"	"	"	40	"	"	"	"	"	"
3	"	"	"	65			"	"	gewechselt	"	68	milchweiß u.gespalt.	"	[illegible]	"	"	.	"	1	"	[illegible]	.
4	Kaninchen	"	"	140			"	4	"	"	144	"	"	"	"	65	"	"	1-7	"	"	"
5	Ratte	"	-40	34			"	2	mit	"	36	milchweiß	"	opak weiß	"	45	"	"	1-?	"	schwach	"
6	"	"	"	4	-20	10	"	"	ohne	"	16	"	"	"	"	40	"	"	1-?	"	"	"
7	"	"	"	24			"	"	"	"	26	"	"	"	"	"	"	6-25	1-?	"	"	"
8	"	"	"	20			"	"	gewechselt	"	22	milchweiß u.gespalt.	"	opak weiß + zersprungen	"	"	"	6-15	2-?	"	stärker	"
9	Kaninchen	"	"	117			"	3	ohne	"	120	milchweiß	"	opak weiß	"	60	"	"	1-4	"	schwach	"
10	Katze	"	"	122			"	"	"	"	125	"	"	"	"	65	"	"	1	"	"	"
11	"	"	"	24	-20	24	"	24	"	"	72	"	"	"	"	60	"	"	1-3	"	stärker	"
12	"	"	"	109			"	3	gewechselt	"	112	milchweiß u.gespalt.	"	opak weiß + zersprungen	"	"	"	"	2	"	schwach	"
13	[illegible]	"	-?0	1			"	1	[illegible]	"	1?	milchweiß	"	opak weiß	"	40	"	"	1-	"	"	"
14	"	"	"	13			"	"	ohne	"	14	"	"	"	"	30	"	"	1-6	"	stärker	"
15	"	"	"				"	"	gewechselt	"	?0	milchweiß u.gespalt.	"	opak weiß + Sprünge	"	35	"	"	1-	"	schwach	"
16	"	"	"	4	0	3	"	"	ohne	"	8	milchweiß	"	opak weiß	"	"	"	"	2-?	"	"	"
17	Kaninchen	"	"	70			"	2	"	"	72	"	"	"	"	65	"	"	1-3	"	"	"
18	[illegible]	"	"	70			"	"	"	"	72	"	"	"	"	"	"	"	1	"	"	"
19	"	"	"	24	0	24	"	8	"	"	56	"	"	"	"	60	"	"	2	"	"	"
20	Ratte	"	-70	Temp. steigt an				6	mit	"	6	"	"	"	"	40	"	"	1-?	"	"	"
21	Kaninchen	"	"	"			"	48	"	"	48	"	"	"	"	65	"	"	1-3	"	"	"
[illegible]	[illegible]	"	"	4			[illegible]	[illegible]		0,?	5	[illegible]	[illegible]	[illegible]	"	40	"	"	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	"	"	"				"	"		0,05	11	teilweise [illegible]	[illegible] zart [illegible]	weiß-[illegible]	"	"	"	"	?-	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	"	"	"	[illegible]			"	[illegible]	ohne	0,0?	75	[illegible]	staubartig	opak weiß + viele Sprünge	"	"	"	"	1-?	erbröckelt	[illegible]	[illegible]
[illegible]	"	"	"	2			"	24	"	0,03-0,01	26	"	"	"	"	"	"	"	2	"	"	"
[illegible]	"	"	"	24			"	2	"	"	"	milchweiß	wolkenartig	opak weiß	"	90	0,01	"	1	erhalten	schwach	leuchtend
	"	"	"	"			"	[illegible]	"	"	"	"	.	"	70	30	,03	"	.	.	[illegible]	[illegible]
[illegible]	"	"	"	"			"	"	"	"	"	"	"	"	80	"	"	"	"	geschrumpft	"	"

5 Diskussion

5.1 Versuchstiere

Bei der Besprechung der im experimentellen Teil dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse, die im Interesse einer möglichst standardisierten Technik als Voraussetzung für erfolgreiche und vergleichsfähige fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Augengeweben erarbeitet wurde, muß berücksichtigt werden, daß die klinischen Fragestellungen sehr verschieden sein können. Bei einer ophthalmologischen Fragestellung wird man sich bemühen, solch ein Versuchstier heranzuziehen, das von seiten der Augen die meisten morphologischen und physiologischen Ähnlichkeiten zum Menschen bietet. Sicher stehen die Affenaugen dem menschlichen Auge am nächsten. Die Anschaffung dieser Tiere wäre jedoch sehr kostspielig in Anbetracht der Tatsache, daß für die Erarbeitung brauchbarer technischer Voraussetzungen für eine Untersuchungsmethode eine relativ große Anzahl von Tieren erforderlich ist. Auch die Fragestellung bestimmt die Wahl des Versuchstieres bzw. der Versuchstiere mit, so daß auch solche Tieraugen für die Untersuchungen herangezogen werden können, die dem menschlichen Auge nur zum Teil in der Morphologie und Physiologie entsprechen.

Intravitale Tieruntersuchungen mit Fluorescein-Natrium wurden von nachstehenden Autoren vorgenommen: SOLLOM & BROWN (1967) arbeiteten mit Kaninchenaugen, BAURMANN (1969, 1970, 1971) benützte für die von ihm vorgesehene Technik albinotische Rattenaugen wegen ihrer "morphologischen Ähnlichkeit mit

dem menschlichen Auge" und wegen ihrer "günstigen Dimensionen". BAURMANN und Mitarbeiter (1975a,b) verwendeten pigmentierte Ratten und Kaninchen, GRAYSON & LATIES (1971) bedienten sich albinotischer Kaninchen und Affen (Saimiri sciurea und Macaca mulatta). MIZUNO (1972a,b) und MIZUNO et al. (1973, 1974) sowie SASAKI (1973, 1976) benutzten ebenfalls Augen von Affen (Rhesusaffen) wie auch von albinotischen und pigmentierten Ratten, Kaninchen und Katzen.

Der Sinn der vorliegenden Arbeit war es, zu einer einheitlichen technischen Verfahrensweise zu gelangen, die nicht nur bei einer, sondern bei verschiedenen Versuchstierarten zur Anwendung gelangen kann, und Vergleiche zwischen ihnen zuläßt. Es wurden daher für diese Arbeit bewußt 3 Tierarten ausgewählt, deren Augen zum Teil große Ähnlichkeiten mit dem menschlichen Auge, teils charakteristische Abweichungen davon aufweisen: 1. Das Kaninchen, ein in der Ophthalmologie gerne und erfolgreich benutztes Versuchstier, da die Morphologie des Kaninchenauges mit Ausnahme der Netzhaut und ihrer Vaskularisierung der des menschlichen Auges entspricht; 2. Die Katze, bei der die Dimensionen des Augapfels denen des Menschen recht gut entsprechen. Der Augenhintergrund weist allerdings die Besonderheiten des Tapetum lucidum auf, das den oberen Teil des Fundus einnimmt. 3. Die Ratte, die bezüglich der Dimensionen des Augapfels stark vom Menschen und von den vorher genannten Tieren abweicht. Es ist ein holangiotisches Auge und abgesehen vom Fehlen der Macula, zeigen Netzhaut und Aderhaut wie auch Ciliarkörper und Regenbogenhaut morphologisch starke Ähnlichkeiten mit dem menschlichen Auge.

Meine Beobachtungen ergaben, daß die bei den untersuchten 3 Tierarten bestehenden anatomischen und morphologischen Unterschiede kaum direkten Einfluß auf die technische Verfahrensweise hatten. Dagegen spielt die Größe der Augen bei ihrer Aufarbeitung eine große Rolle. Der wesentliche Unterschied besteht in der Dauer des Trocknungsverfahrens; dies ist gut aus der Ergebnistabelle ersichtlich.

Für den Prozeß der Gefriertrocknung müssen die Augen eröffnet werden, damit die Trocknung vollständig und in nicht zu langer Zeit erfolgt. Insbesondere bei größeren Augen wie denen des Kaninchens und der Katze, ist eine genügend weite Eröffnung des Augapfels - tunlichst durch seitliche Teilresektion oder durch Teilung des Bulbus - eine conditio sine qua non, da eine zu kleine Eröffnung zu einem zeitlich stark verzögerten und dabei unvollständigen Trocknungsprozeß führt, wodurch die Möglichkeit einer sekundären Diffusion in Betracht gezogen werden muß. Es kommt hinzu, daß ein Schneiden gefriergetrockneter großer Augen mühevoll ist, umso mehr, je größer die zu bearbeitenden Gewebeanteile sind. Eine weitgehende Verkleinerung des Organs würde jedoch einer Zertrümmerung gleichkommen, die ihrerseits erhöhte Gefahren für Artefaktbildungen bedeutet.

5.2 Lokalisation des Fluorescein-Natriums

Zur Analyse des Verhaltens des intravasal injizierten Fluorescein-Natriums in den Geweben der Augen von Versuchstieren bediente sich eine Reihe von Wissenschaftlern im wesentlichen zweier Techniken: 1. der Kryostattechnik und 2. der Technik der Lyophilisierung der Gewebe. Beide Techniken wurden im Zuge dieser Arbeit einer kritischen Prüfung unterzogen. Besondere Aufmerksamkeit wurde der Frage gewidmet, ob und wie weit die jeweilige Technik geeignet ist, unter Ausschaltung sekundärer Diffusionsvorgänge eine Lokalisierung des Fluoresceins in den Augengeweben vorzunehmen. Das besonders starke Diffusionsvermögen dieses Farbstoffs bestimmt das Hauptprinzip, wonach die in Frage kommenden technischen Verfahren zur Aufarbeitung der gewonnenen Augengewebe auszuwählen sind. Sie schaffen die Grundlage für das Anliegen der auf diesem Gebiet arbeitenden Wissenschaftler, den Weg des intravasal injizierten Farbstoffs zu verfolgen. Das Hauptprinzip der feingeweblichen Aufarbeitung ist die Umgehung der wäßrigen Phase, wodurch eine nachträgliche Verlagerung des Farbstoffs, also eine Artefaktbildung, noch möglich wäre.

Es ist einschränkend zu bemerken, daß durch die Verhinderung der sekundären oder nachträglichen Diffusion nur eine der in Frage kommenden Artefaktbildungen ausgeschaltet wird.

Es erscheint angebracht, darauf hinzuweisen, daß die Ausarbeitung einer weitgehend allgemein gültigen Arbeitstechnik für die Durchführung von Untersuchungen für einen bestimmten Fragenkreis nur als Ausgangsbasis für weitere Beobachtungen verstanden werden darf, wenn man Fehlinterpretationen so gut

wie möglich vermeiden möchte. Jeder Untersuchungsmethode haften Fehler an, die einen negativen Einfluß auf die Ergebnisse ausüben; das Ausmaß dieser negativen Einflüsse verringert sich mit der Kenntnis der Fehlerquellen. So müssen auch im Zusammenhang mit den vorliegenden Untersuchungen die Artefaktquellen möglichst genau erkannt und abgegrenzt werden. Außer dem schon vielfach erwähnten a) hohen Diffusionsvermogen des Fluoresceins kommen weitere Faktoren in Frage:

b) mechanische Verlagerungen von getrocknetem Fluorescein beim Schneiden der Gewebe,

c) Verwechslungen von geweblichen Primärfluoreszenzen mit der sekundären Farbstofffluoreszenz infolge ähnlicher Wellenlängen,

d) ungewollte Überdosierungen des Farbstoffs durch die nicht ohne weiteres auszuschließende Möglichkeit, daß die für den Menschen in Erfahrung gebrachte "Normaldosis" auf das Versuchstier oder einzelne Spezies von Versuchstieren nicht anwendbar ist und hier schon den Schrankenmechanismus zwischen Gefäßsystem und Gewebe zum Zusammenbruch bringt (vgl. auch ZAREN et al., 1967, ASHTON & CUHNA-VAZ, 1965), ferner

e) noch nicht erkannte, aber mögliche Unterschiede dieser Schrankenfunktion bei Mensch und Tier und/oder bei verschiedenen Tierarten. Diese Möglichkeit liegt durchaus nahe, wenn man an die verschiedenen Angaben der in der Literatur über die Ergebnisse der Untersuchungen hinsichtlich einer bestehenden oder nicht bestehenden Diffusion des Fluorescein-Farbstoffs in das Netzhautgewebe denkt.

5.2.1 Kryostattechnik

Die Kryostattechnik wurde von SOLLOM & BROWN (1968), BAURMANN (1969, 1971), OTA & TSUKAHARA (1971), MIZUNO et al. (1972) und SASAKI et al. (1973) angewandt, um die Lokalisation des Fluorescein-Natriums in Augengeweben zu untersuchen. Das Hauptprinzip in allen Verfahren, durch die der Weg des intravenös injizierten Fluorescein-Natriums festgestellt werden soll, ist die Umgehung der wäßrigen Phase bei der histologischen Aufarbeitung der gewonnenen Gewebe bzw. Gewebeteile, da das Fluorescein sehr leicht und stark diffundiert. Hinsichtlich dieses Prinzips können sowohl Vorteile als auch Nachteile jeder der Methoden beschrieben werden. Der zweite Schwerpunkt ist es, den geeignetsten Weg zu finden, die Primär- oder Eigenfluoreszenz der Gewebe von der sekundären Fluoreszenz des Fluoresceins so gut wie möglich zu unterscheiden.

SOLLOM & BROWN (1968) beobachteten Kryostatschnitte von Kaninchenaugen nach intravenöser Fluorescein-Injektion und fanden, daß das Fluorescein die Chorioidea überflutete und sowohl die Retina als auch die Sklera anfärbte.

OTA & TSUKAHARA (1971) beobachteten Kryostatschnitte nach Trocknung im Kryostaten. Sie stellten fest, daß der Fluorescein-Natrium-Farbstoff zu unterschiedlichen Enukleationszeiten deutlich nachgewiesen und daß beobachtet werden könne, wie der Farbstoff durch die Gefäßwände dringe.

SASAKI et al. (1973) trockneten im Kryostaten die Schnitte, die in einem Alufolientrichter aufgefangen wurden; es wurde eine Vakuumpumpe am Kryostaten angeschlossen. Sie konnten keine Diffusion des Fluoresceins beobachten.

Bei meinen Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit beobachtete ich sowohl ungetrocknete als auch getrocknete Kryostatschnitte. Bei den getrockneten Schnitten versuchte ich zwei Möglichkeiten: Ein Teil der Schnitte wurde auf den Objektträgern durch geringes Auftauen angeheftet und unter Vakuum lyophilisiert; der andere Teil wurde nur auf die tiefgekühlten Objektträger gelegt und so unter Vakuum lyophilisiert. Bei dem ersten Verfahren fand ich wie erwartet die beschriebene Diffusion, während die zweite Serie eine relativ gute Lokalisation des Farbstoffs ermöglichte.

Nach diesen Untersuchungen läßt sich sagen, daß die Kryostattechnik nach guter Einarbeitung und bei einiger manueller Geschicklichkeit in Verbindung mit der Lyophilisierung der Schnitte folgende Vorteile bietet: Schon in relativ kurzer Zeit kann man die Schnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachten; da die Schnitte bei entsprechender Dünne eine sehr schwache Primärfluoreszenz der Gewebe haben, tritt die Sekundärfluoreszenz um so mehr in den Vordergrund; so besteht eine günstige Möglichkeit, die Eigenfluoreszenz von der sekundären Fluorescein-Fluoreszenz zu unterscheiden.

Die Nachteile dieses Verfahrens bestehen hauptsächlich darin, daß man sehr leicht eine geringe oder auch größere Überschwemmung der Gewebe mit Fluorescein hervorrufen kann. Deswegen ist die oben beschriebene Art des Anheftens der Schnitte auf den Objektträgern ungeeignet. Schnitte unter 10 µ sind schwerer herzustellen und werden durch ein Abheben und durch ein nochmaliges Strecken nach dem Trocknen sehr leicht beschädigt oder unbrauchbar gemacht. Daraus ergibt sich der

weitere Nachteil, daß trotz sorgfältiger Serientechnik eine kontinuierliche Beobachtung von Serienschnitten unter dem Fluoreszenzmikroskop nahezu unmöglich gemacht wird. Es muß hier ein weiterer, allgemeiner Nachteil angeführt werden, der nach meiner Erfahrung bei allen Kryostatschnitten beobachtet werden kann: Durch das Anheften des tiefgefrorenen Auges in toto oder eines Augengewebeteils auf den Kryostattisch, ganz gleich in welcher Weise, entsteht oberflächlich ein Auftauen, das zu einer, wenn auch nur schwachen Diffusion des Fluoresceins führen kann.

5.2.2 Lyophilisierung

Die Trocknungstechnik der Gewebe ist eigentlich die älteste Gewebevorbereitung für die mikroskopische Untersuchung. Es heißt bei PEARSE (1972), daß LEEUWENHOCK sie bereits im Jahre 1720 benutzte und immer wieder Schnitte von getrocknetem Muskelgewebe, die er mit sich herumtrug, unter dem Mikroskop beobachtete. 1890 bewahrte ALTMANN im Vakuum bei -20° C für ein paar Tage kleine Gewebsstücke auf, um sie dann im Vakuum in Paraffin einzubetten. Seither wurde die Gefriertechnik immer weiter verbessert bis zu den heutigen, modernen Lyophilisierungsgeräten.

Die Gefriertrocknungstechnik oder Lyophilisierung der Gewebe umgeht in einem korrekt durchgeführten Verfahren jede Möglichkeit der Entstehung einer wäßrigen Phase, so daß nach vor-

heriger i.v. Injektion von Fluorescein bei den Geweben eine artifizielle Diffusion vermieden wird.

BAURMANN (1969, 1970, 1971) benutzte das Gefriertrocknungsverfahren für seine histologischen Untersuchungen über die Grundlagen der Fluoreszenz-Angiographie des Augenhintergrundes und die Diffusionsverhältnisse im Bereich von Aderhaut und Netzhaut. GRAYSON & LATIES (1971) benutzten ebenfalls die Gefriertrocknung, um die Frage der Fluoresceindiffusion im Gebiet von Aderhaut und Netzhaut zu überprüfen. MIZUNO et al. berichteten 1973 über die Lokalisation des Fluoresceins mit Hilfe der Gefriertrocknung. SASAKI et al. (1973) beschäftigten sich mit einigen technischen Problemen der Fluorescein-Natrium-Lokalisation in den Augengeweben; sie bedienten sich ebenfalls der Gefriertrocknung.

5.2.3 Lyophilisations-Temperatur

Alle oben zitierten Autoren benutzten sehr tiefe Lyophilisations-Temperaturen von -80° C (BAURMANN) bis zu maximal -35° C (GRAYSON), woraus sich eine sehr lange Zeit bis zur Beendigung des Trocknungsverfahrens ergibt. Als ich die Gefriertrocknung bei -80° C, -40° C und -20° C durchführte, stellte ich fest, daß mit dem Anstieg der Lyophilisations-Temperatur sich die Trocknungszeiten wesentlich verkürzten, wie dies aus der Ergebnistabelle hervorgeht. Bei diesen Temperaturen erhielt ich dieselben Ergebnisse sowohl bei makroskopischer als

auch bei fluoreszenzmikroskopischer Beobachtung in bezug auf die Struktur, die Eigenfluoreszenz und die Sekundärfluoreszenz, wie dies ebenfalls aus der Ergebnistabelle ersichtlich ist.

Analoge, diffusionsfreie Ergebnisse erhielt ich auch bei der Durchführung der Lyophilisation unter in Stufen ansteigender Temperatur nach bestimmten Zeitabständen. Die Gesamtzeit verkürzte sich wieder. Bei der Lyophilisierung, die bei sehr tiefen Minus-Temperaturen begonnen und nach sofortigem Ausschalten der Kühlung und unter ansteigendem Vakuum fortgesetzt wurde, erhielt ich die kürzeste Arbeitszeit mit ebenfalls übereinstimmenden makroskopischen und mikroskopischen Ergebnissen. Diese praktisch erzielten Resultate können theoretisch durch die folgenden physikalischen Phänomene erklärt und untermauert werden: Nach MERYMAN (1960) kann die Gefriertrocknung in 3 Etappen betrachtet werden: (I.) Die Wärmezufuhr für die nötige Sublimationsenergie, (II.) die Übertragung der Wassermoleküle von den Eiskristallen auf das schon getrocknete Gewebe und (III.) die Entfernung der Wassermoleküle von der Oberfläche des Gewebes.

Jeder Temperatur ist im Gleichgewichtsfalle ein bestimmter Dampfdruck, der Sublimationsdruck, zugeordnet. So lange dieser noch nicht erreicht ist, sublimiert die Substanz.

Berücksichtigt werden müssen auch die Wärmeübertragungsgesetze, Wärmeleitung, Konvektion (Mitführung) und Strahlung, durch die die Zufuhr von Wärmeenergie stattfindet. Bei der Gefriertrocknung wirken hauptsächlich die Wärmeleitung (zwischen unmittelbar benachbarten Teilchen), wobei der Kontakt zwischen Gewebe und Kühlplatte gegeben ist, und die Strahlung ohne Ver-

mittlung eines materiellen Wärmeträgers; daher sind sie auch im Vakuum wirksam.

Die Notwendigkeit einer bestimmten Quantität an Wärmezufuhr erklärt die Länge der Lyophilisationszeiten bei den vorgenannten Autoren. Selbstverständlich trocknet zuerst das oberflächliche Gewebe. Deswegen erfolgt der Trocknungsprozeß wesentlich schneller und gleichmäßiger, wenn von den tiefgefrorenen Augen vor der Lyophilisierung ein Sektor entfernt wird (SASAKI, 1973), oder, sofern es sich um größere Augen handelt, diese sogar zweigeteilt werden. Die Übertragung der Wassermoleküle von der Eismasse durch das schon getrocknete Gewebe erfolgt auf diese Weise leichter. Durch Wärmezufuhr entsteht ein großer Dampfdruck an der Sublimationsgrenze unter dem schon getrockneten Gewebe. An der Gewebeoberfläche herrscht wegen des Vakuums ein sehr tiefer Druck, so daß ein wesentlicher Druckgradient entsteht. Dieser Druckgradient oder Konzentrationsgradient der Wassermoleküle ist die nötige Kraft, die die Wassermoleküle weiterleitet und sie dann von der Oberfläche des getrockneten Gewebes entfernt.

5.2.4 Phosphorpentoxyd in der Lyophilisation

Der tiefe Dampfdruck an der Oberfläche des Gewebes wird durch das Vakuum mit Hilfe eines chemischen Desikkators oder einer kalten Oberfläche hervorgerufen, also eines Sammlers für Wassermoleküle.

Für gewöhnlich wird das Phosphorpentoxyd (P_2O_5) als chemischer Desikkator benutzt. GARWEG (1968) benutzte das P_2O_5 in der Gefriertrocknung der Gewebeschnitte. PEARSE (1972) empfiehlt, während der Lyophilisation möglichst nahe dem Gewebe Schalen mit P_2O_5 aufzustellen. Dagegen benutzen MIZUNO et al. (1973) Silicagel als Desikkator.

Der chemische Desikkator - in diesem Falle P_2O_5 - hat eine begrenzte Auffangmöglichkeit; daher kann man das Trocknungsverfahren etwas beschleunigen, indem das P_2O_5 mehrmals gewechselt wird. Der Zeitunterschied ist jedoch nicht so wesentlich; hingegen ist die bewirkte Destruktion der Gewebe erheblich. Diese Destruktion wird wahrscheinlich durch zwei Faktoren hervorgerufen: 1. durch die zu schnelle Oberflächentrocknung und 2. durch die Druckunterschiede. Wenn das Zufluten der Luft auch noch so sorgfältig vorgenommen wird, wirkt sich der ansteigende Druck doch stark auf die Gewebeschichten aus. Dies bedeutet, daß ein Wechseln des P_2O_5 bei kleinen Gewebequantitäten ungünstig ist. Wenn, wie im Falle der Kaninchen- oder Katzenaugen, größere Gewebemengen getrocknet werden sollen, ist es eventuell günstiger, wenn sich auf der Kälteplatte sehr rasch und viel Eis bildet und so die Lyophilisierung stark verzögert wird.

Bei der Lyophilisation von kleinen Gewebsstücken vollzieht sich die Trocknung ohne P_2O_5 sehr gut und besonders gleichmäßig. Deswegen zeigen sehr zarte Gewebe wie die Retina bei diesem Verfahren nur wenige Sprünge.

Bei tiefen Minus-Temperaturen spielt der Unterschied hinsichtlich der Trocknungsdauer mit oder ohne P_2O_5 kaum eine

Rolle; jedoch zeigen die äußeren Gewebeschichten ohne P_2O_5 weniger Spaltbildungen.

Bei der Vakuumtrocknung mit schnellem Temperaturanstieg spielt der chemische Desikkator jedoch eine sehr wichtige Rolle. Da durch den Temperaturanstieg die Sublimation stark beschleunigt wird, müssen auch die Wassermoleküle rascher entfernt werden. So ist es von Nutzen, neben dem Vakuumsystem über die zusätzliche Auffangmöglichkeit eines chemischen Desikkators zu verfügen.

5.3 Unterschied Primärfluoreszenz - Sekundärfluoreszenz

Die genaue Lokalisation des Fluorescein-Natriums ist stark abhängig von dem Unterschied zwischen der Fluoreszenz der Gewebe (Primär- oder Eigenfluoreszenz) und der Fluoreszenz des Farbstoffs (Sekundärfluoreszenz). Ein größerer oder geringerer Unterschied kann zu einer Erleichterung bzw. zu einer Erschwerung einer vorzunehmenden Beurteilung führen, wenn er nicht sogar zu fehlerhaften Beurteilungen Anlaß gibt.

Was die Unterscheidung von Primärfluoreszenz und Sekundärfluoreszenz im Falle des Fluorescein-Natriums betrifft, so ist wichtg, in welchem Maße ihr Unterschied verändert wird. Diese Veränderungen betreffen hauptsächlich die Intensität der Eigenfluoreszenz. Letztere ist nicht zuletzt in starkem Maße abhängig von der Schichtdicke und vom Trocknungsgrad. Die Unter-

scheidung von Primär- und Sekundärfluoreszenz, die beide je nach Schichtdicke bzw. Konzentration des Farbstoffs additiv verstärkt werden können, ist mit verhältnismäßig großer Zuverlässigkeit nur dann möglich, wenn die Schnitte mit Fluorescein und die Schnitte ohne Fluorescein unter einander vergleichbaren Bedingungen angefertigt werden. Es ist darüber hinaus jedoch zu berücksichtigen, daß im Falle der zu untersuchenden Augengewebe im Bereich von Aderhaut und Netzhaut sowie Iris und Ciliarkörper der Grad der Pigmentation eine nicht zu unterschätzende Rolle spielen kann. Hierauf verweisen die Ergebnisse, die JAH (1970) bei seinen Untersuchungen über die Verteilung des Fluorescein-Natriums nach intravenöser Injektion in Organgeweben, u.a. auch im Auge, fand. Es besteht begründeter Anlaß zu der Annahme, daß das Pigment eine fluoresceinretinierende Eigenschaft besitzt. Vergleicht man die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungsergebnisse von BAURMANN (1969, 1971) an Aderhaut und Netzhaut der albinotischen Ratte mit Ergebnissen, die an pigmentierten Ratten, pigmentierten Kaninchen und an Affen gefunden wurden (MIZUNO, 1972; MIZUNO et al., 1973, 1974; SASAKI et al., 1973; OTA & TSUKAHARA, 1971; GRAYSON & LATIES, 1971), so gewinnen die von JAH gemachten Beobachtungen hinsichtlich des Mechanismus der Blut-Gewebe-Schranke im Bereich der Augengewebe an Bedeutung. Sicherlich spielt auch die Konzentration des Farbstoffs eine wesentliche Rolle, worauf die obengenannten unterschiedlichen Ergebnisse hindeuten.

5.3.1 Wassergehalt der Gewebe

Bereits 1911 findet man eine Erklärung von STÜBEL, der sich eingehend mit der Fluoreszenz tierischer Gewebe befaßte und feststellen konnte, daß die Intensität der Fluoreszenz vom Wassergehalt der Gewebe abhängig ist. Je geringer dieser Wassergehalt ist, desto stärker fluoresziert das Gewebe.

In meinen Versuchen konnte ich die unterschiedlichen Eigenfluoreszenzen bei verschiedenen Trocknungsgraden feststellen.

Die Übertrocknung der Gewebe ist eine der Ursachen, die zu einem starken Anstieg der Eigenfluoreszenz der Gewebe führte. Bei ungenügender Trocknung, d.h. wenn zum Beispiel in der Aderhaut noch eine beschränkte Fluorescein-Diffusion stattfinden konnte, bestand noch keine Eigenfluoreszenz der Gewebe. Es konnte jedoch durch die große Zahl der Versuche (fast 200) mit Hilfe von Druckbeobachtungen und makroskopischen Befunden festgestellt werden, wo die geeignete Lyophilisationsgrenze für die Fragestellung meiner Arbeit lag, so daß keine Fluorescein-Diffusion stattfinden und die geringste Eigenfluoreszenz erzielt werden konnte. Diese Grenze lag unter den gegebenen Bedingungen bei einem Druck von 10^{-2} Torr. Nach PEARSE (1972) befinden sich bei diesem Grenzwert noch Reste von Wassermolekülen im Gewebe. Diese Reste erwiesen sich jedoch als unbedeutend. Sie können keine artefaktbildende Sekundärdiffusion erzeugen und die Primärfluoreszenz ist schwächer.

5.3.2 Einbettung

Bei der Einbettung konnten die Zeit und die Temperatur als weitere Faktoren festgestellt werden, die auf den Anstieg der Eigenfluoreszenz einwirken.

Es wurde keine automatische Einbettung durchgeführt, wie sie von PEARSE (1969) empfohlen und von BAURMANN (1971) durchgeführt wurde. Es erschien erstens nutzvoll, nach der beendeten Gefriertrocknung die Linse zu entfernen, um Artefaktmöglichkeiten bei ihrem Mitschneiden zu vermeiden. Das Entfernen der Linse war möglich, weil a) die Augen bereits geöffnet waren und so keine Gefahr bestand, umfangreiche Destruktionen zu verursachen, b) der Schwerpunkt der mikroskopischen Beobachtungen nicht der Linse galt. Zweitens war es wichtig, vor der Einbettung einen makroskopischen Eindruck vom Grad der Lyophilisation zu erhalten.

Durch diese zusätzliche Maßnahmen wird die Einbettungszeit nicht wesentlich verlängert; sie beträgt selbst bei großen Gewebestücken auch unter diesen Umständen nie mehr als 45 - 50 Minuten. Es wurden kurze und lange Einbettungszeiten getestet; als Ergebnis ergab sich, daß eine Gesamtzeit bis zu einer Stunde keinen Anstieg der Eigenfluoreszenz bewirkte. Zu kurze Zeiten jedoch erschweren die Schnittherstellung durch Gasreste, wodurch kein richtiges Durchtränken des Gewebes mit Paraffin möglich wird.

Zu hohe Einbettungstemperaturen führen zu einem starken Anstieg der Eigenfluoreszenz und es kann bis zum Schrumpfen der Gewebe kommen, wenn der Temperaturanstieg zu hoch ist.

Das Einbettungsmedium muß daher folgende Eigenschaften haben: Es muß fluoreszenzfrei sein und einen niedrigen Erstarrungspunkt besitzen, um eine entsprechende Härte für die Anfertigung von Schnitten zu erhalten.

5.3.3 Schnittdicke

Die Schnittdicke verändert ihrerseits das Erscheinen der Fluoreszenz. Je dicker die Schnitte sind, um so stärker ist deren Fluoreszenz (Summationseffekt). Da die bereits schon stark leuchtende Fluorescein-Fluoreszenz diesbezüglich keinen so großen Unterschied zeigt wie die für gewöhnlich schwache Eigenfluoreszenz, welche bei dickeren Schnitten durch Summation sehr kräftig werden kann, sind dickere Schnitte als 15 µ problematisch für die Fluorescein-Lokalisation. Wenn es sich nur um die Eigenfluoreszenz-Darstellung handelt, können dickere Schnitte einen Vorteil bieten, indem man so die Gewebsfluoreszenz leichter beobachten und besonders gut photographisch dokumentieren kann (Abb.40/41).

Im Zusammenhang hiermit sei nochmals auf die auseinanderweichenden fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse der bereits früher (Seite 77) genannten Autoren verwiesen. Es ist durchaus möglich, daß bei mangelndem Pigmentgehalt oder bei albinotischen Geweben erst eine etwas stärkere Schnittdicke eventuell ablaufende Diffusionsvorgänge des Fluoresceins sichtbar macht.

. : ıtiertes Rattenauge; Kontrollauge, 8 µ; Filter
: Fujichrome; 150 Sekunden.
Kaum wahrnehmbare Eigenfluoreszenz der Netzhaut, der Sklera und der Wände der größeren Aderhautgefäße (x63)

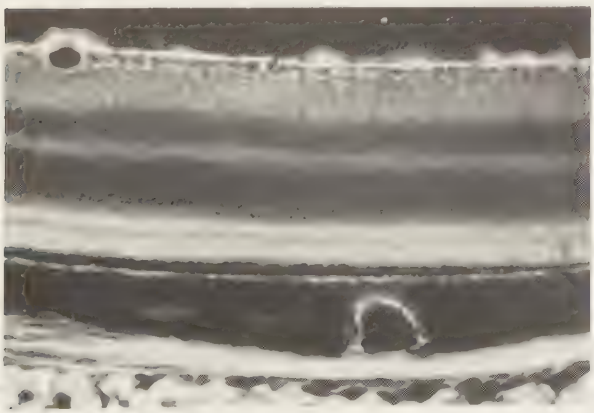


Abb. 41: Pigmentiertes Rattenauge; Kontrollauge, 20 µ; Filter BG 12; Fujichrome; 120 Sekunden.
Erhöhte Eigenfluoreszenz derselben Gewebe (vgl. Abb. 37) (x63)

5.3.4 Strukturveränderung

Strukturelle Veränderungen können auch durch Gefrierschock, Übertrocknung oder durch Druckveränderungen, die im Endeffekt auch die Fluoreszenzintensität beeinflussen, hervorgerufen werden. Wie erwähnt führt eine Übertrocknung zu Geweberissen, besonders in der so zarten Retina, die als Spalten, ähnlich wie in ausgetrockneter Erde, sichtbar werden. Die Kanten dieser Spalten zeigen eine kräftige Fluoreszenz. Gewöhnlich ist es erhöhte Eigenfluoreszenz infolge von Übertrocknung, die eine Summation erzeugt. In manchen Spalten kann man auch eine Fluorescein-Fluoreszenz erkennen, die wahrscheinlich von Kapillaren oder von Gefäßschädigungen stammt. Hier muß die Ursache im Gefrierschock liegen, da während der Gefriertrocknung keine Fluorescein-Diffusion entstehen kann.

5.3.5 Alter der Präparate

Nach Bommer (1929) "ist die Eigenfluoreszenz der Gewebe nicht flüchtig, sondern ziemlich beständig", zitiert nach HEYDENREICH. Das trifft dann zu, wenn die Eigenfluoreszenz ihr Maximum erreicht hat. So lange kann man den ständigen Anstieg beobachten.

Eine entscheidende Rolle für den Grad der Primärfluoreszenz und damit für die Unterscheidung der Primärfluoreszenz von der Sekundärfluoreszenz spielt der Zeitraum zwischen der Herstel-

lung der Präparate, dem Anlegen der Schnitte und deren Beobachtung unter dem Mikroskop. Die Gewebefluoreszenz steigt so schnell an, daß bereits nach 24 Stunden ein störender Effekt entsteht. Dieser Prozeß kann - wenn auch nur wenig - gebremst werden, indem man die Präparate in einem kühlen, dunklen Raum aufbewahrt. Auch so findet man eine erhöhte, störende Eigenfluoreszenz schon nach 7 - 10 Tagen. Es ist daher, wenn man Fluorescein-Natrium lokalisieren will, nicht ratsam, Präparate zu benutzen, die älter als eine Woche sind.

5.4 Fluoreszenzmikroskopische Dokumentierung

5.4.1 Fluoreszenzmikroskop

Die besten fluoreszenz-photographischen Ergebnisse wurden mit einem Fluoreszenz-Photomikroskop mit Auflichtanregung erzielt. Der Vorteil des Auflichtverfahrens besteht in der hohen Fluoreszenzintensität. Bei der Durchlichtfluoreszenzmikroskopie hat man einen starken Lichtverlust wegen Streuungen und Eigenabsorptionen im Präparat zu gewärtigen. Eine schematische Darstellung des Prinzips bei Auflicht- und Durchlichtanregung zeigt Abbildung 42.

Das Beleuchtungsverfahren in der Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie entsteht dadurch, daß die Erregerstrahlen über einen Auflichtilluminator mit dichromatischem Teilerspiegel durch

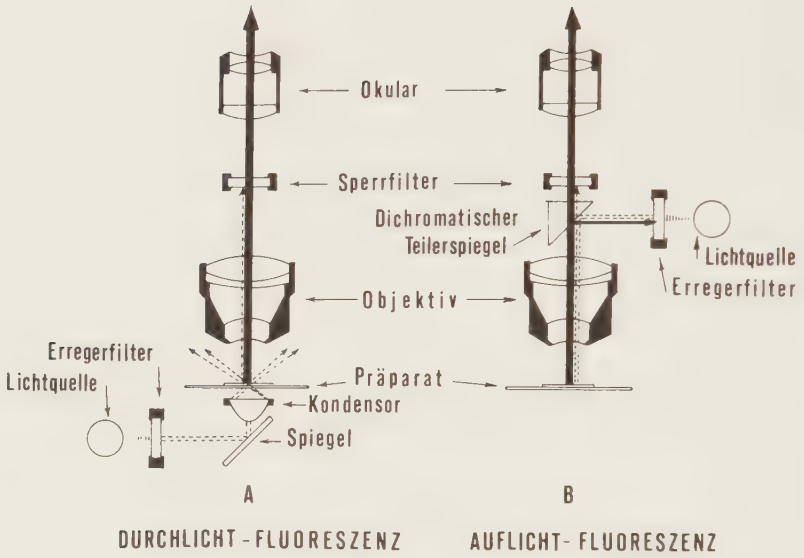


Abb. 42: Strahlengang bei A) Durchlicht-Fluoreszenz und
B) Auflicht-Fluoreszenz

das Objektiv des Mikroskops auf das Präparat fallen. Deswegen ist die Intensität der Erregungsstrahlen abhängig von der numerischen Apertur des benutzten Objektivs, so daß es zweckmäßig ist, Objektive hoher Apertur zu benutzen.

5.4.2 Filter

Präparat und Fluoreszenzfärbung bestimmen die Wahl der verschiedenen Filter und Filterkombinationen. Die Filter unterscheiden sich durch die spektralen Werte für die Excitation und für die Emission. Die Filterkombinationen für Anregung unterscheiden sich nach der Bandbreite in Nanometern als Breitband-Anreger, Schmalband-Anreger und Selektiv-Anreger.

Die Breitbandanregung ist die klassische Fluoreszenzmethode, in der das Fluoreszenzlicht ab einer bestimmten Wellenlänge über Sperrfilter beobachtet wird. Die Methode wird sowohl im Auflicht als auch im Durchlicht dann angewandt, wenn die maximalen Werte der Anregung (Excitation) und der Fluoreszenz (Emission) weit auseinander liegen. Da das Erregerfilter einen breiten Durchlaßbereich hat, kann die Fluoreszenz mit genügender Energie angeregt werden, um dann durch ein Sperrfilter beobachtet zu werden. Das echte Fluoreszenzlicht ist nur durch Sperrfilter zu beobachten, die wegen ihrer Kantenlänge nur die Fluoreszenz durchlassen, während sie die Erregerstrahlen vollständig aussperren.

Da das Zustandekommen der Fluorescein-Fluoreszenz von verschiedenen Faktoren beeinflußt wird, sind die Angaben über ihre Absorptions- und Emissionswellenlängen sehr unterschiedlich. Im blauen Bereich des sichtbaren Spektrums reicht die Skala von 465 nm bis 495 nm für das Excitationsmaximum. Das Emissionsmaximum im grünen Spektralbereich reicht danach von 505 nm bis 535 nm. Diese weit auseinander liegenden Daten wurden unter Lösung des Farbstoffs in Plasma oder Vollblut gemes-

sen, die der gegebenen Problemstellung am nächsten kommen (COSTERHUIS & LAMMENS, 1965; HAINING & LANCASTER, 1968; HODGE & CLEMETT, 1969; BAURMANN, 1971, u.a.).

Viel einheitlicher sind die Mitteilungen über Excitationsmaximum und Emissionsmaximum des Fluorescein-Natriums in wäßriger Lösung (EMMART, 1958; HAITINGER, 1959; NAIRN, 1964; BAURMANN, 1971; HYVÄRINEN et al., 1971). Hier liegt das Excitationsmaximum bei etwa 490 nm im blauen Bereich des Spektrums und das Emissionsmaximum bei 520 nm im grünen Spektralbereich. Die Eigenfluoreszenz der Gewebe wird unter dem Einfluß von Ultraviolett-Strahlen hervorgerufen. HAITINGER (1959) und FRANÇON (1967) fanden, daß der Excitationsbereich vieler Eiweißstoffe und Nucleinsäuren zwischen 250 nm bis 300 nm liegt.

Die Wahl der im Fluoreszenzmikroskop benutzten Filter berücksichtigt diese Wellenlängen. HEYDENREICH (1968) weist darauf hin, daß die Eigenfluoreszenz am besten erfaßt wird mit dem Erregerfilter BG 3 und Sperrfilter 41 (Schott) sowie Sperrfilter 44 (Schott). BAURMANN (1971) testete die im Zeiss-Fluoreszenzmikroskop vorhandenen Filter BG 12, BG 3, UG 1, UG 5 und BG 38. Mit Ausnahme des Filters BG 38 liegen die Excitationsmaxima der anderen ebenfalls breitbasigen Filter bei etwa 250 nm bis 490 nm. Das heißt, daß die Eigenfluoreszenz miterfaßt wird.

MIZUNO et al. (1973) und SASAKI et al. (1973) benutzten als Erregerfilter den Balzer FITC-Filter mit Sperrfilter Fuji Y-52. Sie verwendeten auch eine Filterkombination Baird-Atomic B-4 und B-5; sie sind der Meinung, daß mit diesen Interferenz-Breitbandfiltern die Fluorescein-Natrium-Fluoreszenz "frei von

Primärfluoreszenz" sei. Das Erregerfilter BG 12 und das Sperrfilter Zeiss 47 wandte GRAYSON (1971) an, ohne sich näher darüber zu äußern.

Da es in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich darum ging, ein möglichst einheitliches Verfahren zur Herstellung von Präparaten auszuarbeiten, wurde nach selektiven Vorbeobachtungen die Dokumentierung mit dem Fluoreszenz-Photomikroskop nur mit den erwähnten Filterkombinationen vorgenommen. Dabei ist das 3 mm BG 12 Erregerfilter das klassische Filter in der Fluorescein-Fluoreszenzmikroskopie. Wie aus der Filterkurve der Abbildung 43 zu ersehen ist, liegt sein wirksamer Bereich zwischen etwa 340 nm und 500 nm; das Excitationsmaximum wird bei etwa 400 nm erreicht, so daß die Eigenfluoreszenz miterfaßt wird. Die Interferenz-Filterkombination, bei der der wirksame Bereich des Erregers zwischen 350 und 500 nm liegt (Abb.44), bietet den Vorteil einer Selektivanregung. Ein kleinerer Bereich der Eigenfluoreszenz wird miterfaßt.

Dagegen liegt das Excitationsgebiet des Erregerfilters für Ultraviolett (Abb.45) zwischen 260 nm und 440 nm bei einem Excitationsmaximum von 350 nm. Mit diesen Erregerfiltern wird ein größerer Bereich der Eigenfluoreszenz erfaßt, wobei aber die Fluorescein-Fluoreszenz nicht eliminiert wird. Bei diesen Filtern gibt es noch einen zusätzlichen Excitationspeak, der jedoch nicht zur Geltung kommt wegen der Wirksamkeit des entsprechenden Sperrfilters, dessen wirkungsvoller Bereich aus den Abbildungen 43, 44 und 45 hervorgeht.

Eine scharfe Trennung der Eigenfluoreszenz von der Sekundärfluoreszenz ist mit diesen Filterkombinationen nicht möglich.

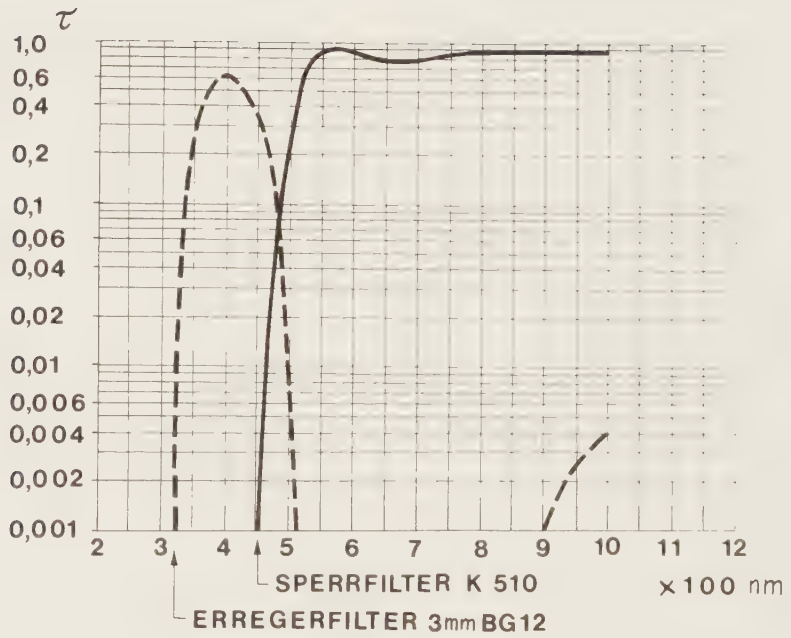


Abb. 43: Filterkurven der Erregerfilter BG 12 (3 mm) und Sperrfilter K 510

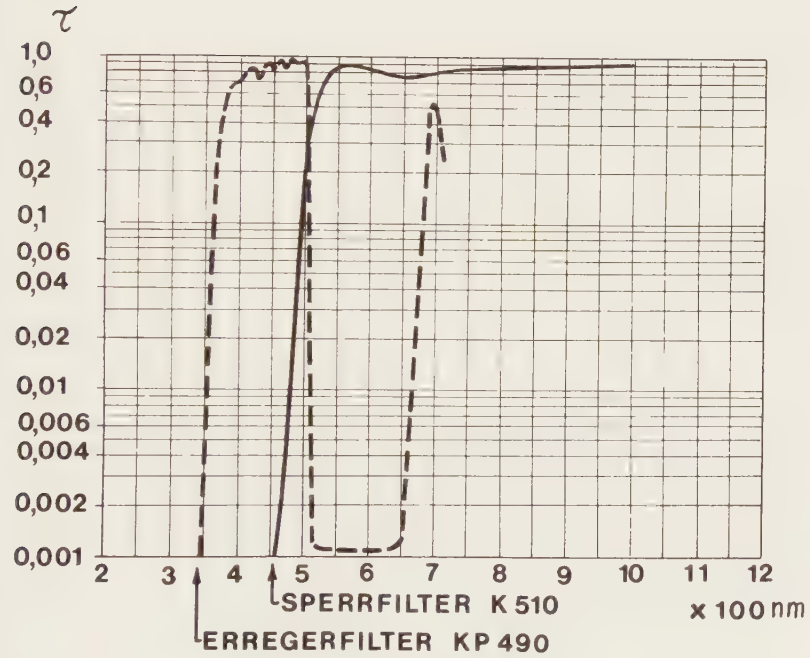


Abb. 44: Filterkurven der Erregerfilter KP 490 und Sperrfilter K 510

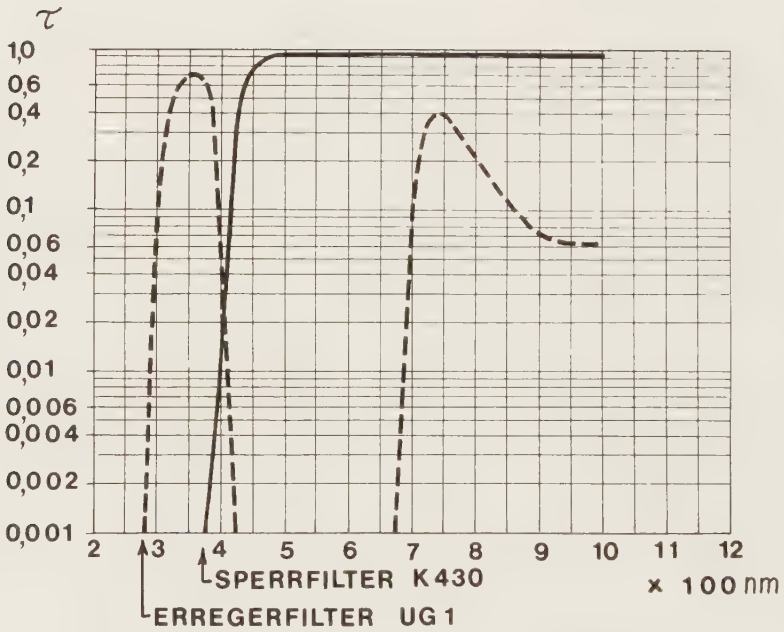


Abb. 45: Filterkurven der Erregerfilter UG 1 (1 mm) und Sperrfilter K 430

Nach [illegible] ständige vergleichende Beobachtungen und Vergleichsaufnahmen von Kontrollaugen und Augen mit Fluorescein sowie parallelen Untersuchungen mit Ultraviolett- und Blaulichtanregung an ein und derselben Stelle, kann man sich ein Urteil hinsichtlich einer Unterscheidung von Eigenfluoreszenz und Fluorescein-Fluoreszenz erarbeiten. Es soll hier erwähnt werden, daß im Interesse einer möglichst naturgetreuen Wiedergabe die [illegible]n Präparate vor geplanten photographischen Aufnahmen der Fluoreszenz-Erregerlicht nicht lange aussetzen soll, um [illegible]ien, daß Flecken "ausgelaugter Fluoreszenz" entstehen [illegible]. Je höher die numerische Apertur des benutzten [illegible], desto schneller erfolgt das "Auslaugen" der [illegible].

Abb. 46: Ausgelaugte Stelle, entstanden durch Beobachtung mit dem Objektiv 25/0.50
Darauffolgende Aufnahme mit Filter BG 12 (3 mm) (x25)

5.4.3 Filmmaterial

Um den Unterschied Primärfluoreszenz - Sekundärfluoreszenz sowie eine Lokalisation des Fluoresceins zu dokumentieren, bedarf es einer gewissen Einarbeitung mit dem entsprechenden Aufnahmematerial (Film-Typ usw.) und einer ausreichenden Kenntnis seiner Eigenschaften. Leider sind über das benutzte Filmmaterial und dessen Bearbeitung die Literaturangaben recht spärlich.

HEYDENREICH (1968) vertritt folgende Meinung über die Mikrophotographie von fluoreszierenden Objekten: "Bei Schwarz-Weiß-Aufnahmen beträgt die Belichtungszeit je nach der Stärke der Fluoreszenzerscheinung bei Verwendung von 17° DIN etwa 45 bis 120 Sekunden. Bei Farbaufnahme sind längere Belichtungszeiten nötig... Zur Farbphotographie der Eigenfluoreszenz braucht man bei Blaulicht-Fluoreszenz mindestens eine Belichtungszeit von 10 - 20 Minuten, bei Ultraviolett-Fluoreszenz fast doppelt so viel."

BAURMANN (1971) befand für Schwarz-Weiß-Aufnahmen die Filme KB 17 und KB 21 als die günstigsten und für Farbaufnahmen den Kodak-Ectachrome high speed-Film als den günstigsten.

MIZUNO et al. (1973, 1974) benutzten für Schwarz-Weiß-Aufnahmen den Kodak-Film TRI-X und für Farbaufnahmen einen Fuji-Film mit 100 ASA, für den sie Belichtungszeiten zwischen 20 Sekunden und 6 Minuten angegeben haben.

Wie aus 3.6.3 hervorgeht wurden für meine Arbeit alle zur Verfügung stehenden Tageslichtfilme getestet weil die Lichtquelle der benutzten Fluoreszenzmikroskope dem Tageslicht ent-

spricht. Es muß hierzu erwähnt werden, daß sich die Schwarz-Weiß-Filme im allgemeinen nicht sehr gut für Fluoreszenzaufnahmen eignen, da viele Einzelheiten verloren gehen, insbesondere, wenn die Filme speziell auf Kontrast hin bearbeitet werden. Es kann sehr leicht die Eigenfluoreszenz mit der Fluorescein-Fluoreszenz verwechselt werden, was bei Lokalisationsversuchen des Fluoresceins zu groben Fehlern führen kann.

Die Belichtungszeit bei Violettlichtanregung betrug etwa das Doppelte der Blaulichtanregung, wenn mit demselben Filmmaterial gearbeitet wurde und es sich um dieselbe oder um eine ähnliche Aufnahmestelle handelte, wobei aber das Auslaugen der Fluoreszenz fast unbedeutend ist im Vergleich zur selben Belichtungszeit bei Blaulichtanregung. Deswegen ist es günstig - wenn lange Belichtungszeiten nötig sind - zuerst mit Violettlichtanregung und dann mit Blaulichtanregung ein und dieselbe Stelle zu photographieren.

Gute Aufnahmen wurden bei meinen Untersuchungen unter Blaulichtanregung mit Fuji-Filmen (21° DIN) erzielt, die eine Spezialbehandlung auf eine höhere DIN-Zahl erfuhren; dabei lag die Belichtungszeit hauptsächlich bei 2 - 3 Minuten. Die Bilder unter Violettlichtanregung wurden mit Kodak-Ectachrome Tageslichtfilmen (22° DIN) sowie mit dem Tageslichtfilm Agfachrome professional 50 b (22° DIN) aufgenommen und normal entwickelt.

Hier muß erwähnt werden, daß jedes Filmfabrikat eine spezifische Farbgebung aufweist. Die Abbildungen 33 - 39 lassen deutlich erkennen, daß bei den Aufnahmen auf Kodakfilm ein grünlicher Farbton, bei denen auf Agfafilm ein gelblicher und

bei denen auf Fujifilm ein bräunlicher Farbton vorherrscht. Es ist aber anzunehmen, daß farbgetreue Aufnahmen auch mit anderen Farbfilmen erreicht werden können; erforderlich wäre hierfür wohl lediglich die Ausarbeitung einer adäquaten Belichtungszeit und Entwicklungstechnik, speziell auf diese Filme ausgerichtet, wie sie im Zuge meiner Untersuchungen für die Fuji-Filme erarbeitet wurde. Es wäre wichtig, daß eine solche Technik auch eine konstante Anwendung fände, damit - auch aus dieser Warte gesehen - ein einheitliches Vorgehen gewährleistet würde.

Ein wesentlicher Unterschied hinsichtlich der farbgetreuen Wiedergabe besteht zwischen den Aufnahmen mit Farbdiapositiv- und Farbnegativ-Filmen. KOCH (1972) bemerkt, daß die Farbnegativ-Filme im allgemeinen niedrigere Empfindlichkeiten aufweisen und bei der Reproduktion zur Herstellung von Positiv-Bildern recht stark dem subjektiven Ermessen unterliegen. KOCH meint weiterhin, daß sich selbst für Schwarz-Weiß-Wiedergaben im Druck die Reproduktion nach Farbvorlagen empfiehlt; solche Vorlagen lassen sich am besten nach Farbdiapositiven anfertigen.

Es scheint jedoch an das Unmögliche zu grenzen, die Fluoreszenzbilder genau so zu reproduzieren, wie sie das beobachtende Auge im Fluoreszenzmikroskop wahrnimmt. Diese großen Schwierigkeiten erklären sich aus den vielen variablen Faktoren, die bei ein und derselben Aufnahme zusammenkommen: Präparat, Filmtyp, Belichtungszeit, Filmbearbeitung usw. Auch bei der Anwendung der automatischen Belichtung erhält man nicht immer die idealen Belichtungszeiten, da die Präparate relativ

große Verschiedenheiten aufweisen, die sich aus den unterschiedlichen Gewebsstrukturen bzw. Gewebsformationen erklären, die der auf das Zentrum der jeweiligen Bilder geeichte Lichtfühler nicht voll berücksichtigen kann; denn der Lichtfühler fällt auf sehr unterschiedliche Stellen. Wahrscheinlich deswegen wurden die besten Aufnahmen für diese Arbeit mit Integralmessungen erzielt. Auch aus diesen Gesichtspunkten betrachtet erscheinen die unterschiedlichen fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungsergebnisse hinsichtlich der Diffusionsverhältnisse im Grenzbereich von Aderhaut und Netzhaut, wie sie von verschiedenen Autoren gefunden wurden, verständlicher.

Das schwierigste und wichtigste Problem in der Fluoreszenz-Mikrophotographie bleibt aber die Reproduktion der schwächsten Fluoreszenzerscheinungen, die ein gut adaptiertes Auge im abgedunkelten Raum am Fluoreszenzmikroskop noch wahrnehmen kann. Für ihre Wiedergabe müßte man - wenn sie überhaupt gelingen soll - durch Manipulation zum Beispiel der Schnittdicke usw. eingreifen, was jedoch sehr leicht zu Fehlbeurteilungen führen kann.

6 Gesamtergebnis

Aufgrund der zitierten Literatur und eigener Beobachtungen soll als Arbeitsmethodik für die hier vorgestellte Technik der Fluoreszenzmikroskopie folgendes hervorgehoben werden:

Für kurzfristig gewünschte oder erforderliche Untersuchungsbefunde kann man die Kryostatschnitte benutzen, jedoch nur nach Vakuumtrocknung, da die Verwendung des diffusionsfreudigen Farbstoffs Fluorescein-Natrium die Umgehung der flüssigen Phase unumgänglich macht. Am vorteilhaftesten ist es, das Gewebe vor dem Schneiden mittels Carboxymethylcelulose auf dem Tischchen des Kryostaten anzubringen. Die gleich darauf vorzunehmende Beobachtung der Kryostatschnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop gestattet nicht die Auswertung bzw. die Differenzierung von Primär- und Sekundärfluoreszenzen der Gewebe.

Für die etwas langwierigere Herstellung von Paraffinschnitten soll das Gewebe nach dem Tieffrieren so schnell wie möglich in die Lyophilisationsanlage gebracht werden. Das schnellste Trocknungsverfahren unter sicherer Umgehung der flüssigen Phase wird erreicht, wenn bei einem Vakuum von etwa 10^{-1} Torr die Temperatur langsam erhöht wird. Wenn bei Raumtemperatur der Druck konstant bei etwa 10^{-2} Torr bleibt oder ansteigt, ist das Gewebe genügend lyophilisiert. Ein langsames Zufluten von Luft unter die Vakuumglocke ist notwendig, um eine zusätzliche Desintegrierung der Gewebe zur vermeiden.

Die Einbettung in Paraffin bei nicht höherer Temperatur als +60° C und bei einem Anstieg des Vakuums auf 4^{-2} bis 3^{-2} Torr

- jedoch nicht länger als eine Stunde - ergibt gute Präparate.

Ebenfalls nützlich und besonders wichtig für die Dokumentierung und Auswertung der Primär- bzw. Sekundärfluoreszenzen ist weiter das sofortige Betrachten und Photographieren der Schnitte frischer Präparate; dabei soll man das Präparat vor dem Photographieren so kurz wie möglich unter den Fluoreszenzfiltern des Mikroskops beobachten.

Die naturgetreueste Reproduktion und Dokumentierung erfolgt mit Diapositivfilmen. Die Wahl des Filmtyps ist abhängig von der Lichtquelle des Fluoreszenz-Photomikroskops und muß vorher jeweils getestet werden.

7 Ausblick

Es wäre sicher ein großer Fortschritt, wenn sich die Primärfluoreszenz sowie die Sekundärfluoreszenz so objektiv wie möglich beurteilen ließen. Dabei würde - wenn technisch möglich - eine Verbindung zur Elektronenmikroskopie die sichersten Angaben über die Wege und Diffusionsgrenzen des Fluorescein-Natriums liefern.

8 Zusammenfassung

In enger Verbindung zu bisherigen Versuchen wurde der Versuch unternommen, eine einheitlichere Methodik zur Untersuchung der Diffusionsverhältnisse für den Farbstoff Fluorescein-Natrium im Bereich der Gefäße und der Gewebe des Auges sowie für den Vergleich von Primärfluoreszenzen der Augengewebe und der Fluorescein-bedingten Sekundärfluoreszenz auszuarbeiten.

Unter gleichen Bedingungen wurden Augen von albinotischen und pigmentierten Ratten, von Kaninchen und Katzen benutzt. Es wurde bei den Tieren dieselbe pro Kg-Dosis Fluorescein-Natrium appliziert, wie sie beim Menschen für die klinische Angiographie von Augenhintergrund und Augenvorderabschnitt üblicherweise angewandt wird.

Vor der i.v. Farbstoffinjektion wurde bei den Tieren jeweils ein Auge als Kontrollauge enukleiert. Das andere Auge wurde bei jedem Tier unter Einhaltung etwa desselben Zeitabstandes nach der i.v. Injektion ebenfalls enukleiert. Beide Augen wurden möglichst schnell in Trockeneis mit Aceton tiefgefroren. Unter verschiedenen Bedingungen wurden Kryostatschnitte und Paraffinschnitte hergestellt, wobei die verschiedensten Lyophilisationsbereiche, Einbettungstemperaturen und -zeiten sowie Zeitabstände der Beobachtung geprüft und ausgewertet wurden. Die Auswertung berücksichtigte die Lichtquelle des benutzten Fluoreszenzmikroskops sowie die Filterkombinationen und das verwandte Filmmaterial. In Gegenüberstellung mit den verschiedensten Literaturangaben wurden die eigenen Ergebnisse auf ihre Vor- und Nachteile hin überprüft und diskutiert.

9 Literaturverzeichnis

ALTMANN, R.: Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen. Veit: Leipzig (1890)

ASHTON, N.: Vascular changes in diabetes with particular reference to retinal vessels. Brit.J.Ophthal. 33, 407-420 (1949)

ASHTON, N. & PEDLER, C.: Studies on developing retinal vessels. IX: Reaction of endothelial cells to oxygen. Brit.J.Ophthal. 46, 257-276 (1962)

ASHTON, N. & HENKIND, P.: Experimental occlusion of retinal arterioles. Brit.J.Ophthal. 49, 225-234 (1965)

ASHTON, N. & CUNHA-VAZ, J.G.: Effect of histamine on the permeability of the ocular vessels. Arch.Ophthal. (Chicago) 73, 211-223 (1965)

ASHTON, N., DOLLERY, C.T., HENKIND, P., HILL, D.W., PATERSON, J.W., RAMALHO, P.S. & SHAKIB, M.: Focal retinal ischaemia. Ophthalmoscopic circulatory and ultrastructural changes. Brit.J.Ophthal. 50, 281-384 (1966)

BAURMANN, H.: Die Gefäßpermeabilität von Netzhaut und Aderhaut aus der Sicht klinischer und experimenteller Fluoresceinbefunde. Ber.dtsch.ophthal.Ges. 70, 242-246 (1969)

BAURMANN, H.: Grundlagen der Fluoreszenzangiographie des Augenhintergrundes. Experimentelle Untersuchungen. Habilitationsschrift, Bonn (1969)

BAURMANN, H.: Experimentelle Untersuchungen zur Fluoreszenzangiographie. Klin.Mbl.Augenheilk. 156, 579 (1970)

BAURMANN, H.: Grundlagen der Fluoreszenzangiographie des Augenhintergrundes. Adv.Ophthal. 24, 204-268 (1971)

BAURMANN, H., SASAKI, K., CHIORALIA, G., HENDRICKSON, P. & HATA, N.: Experimentelle Fluorescein-angiographische Untersuchungen an laserbehandelten Tieraugen. Klin.Mbl.Augenheilk. 167, 702-704 (1975)

BAURMANN, H., SASAKI, K. & CHIORALIA, G.: Investigations on Laser-Coagulated Rat Eyes by Fluorescence Angiography and Microscopy. Graefes Arch.Ophthal. 193, 245-252 (1975)

BERNSTEIN, M.H. & HOLLENBERG, M.J.: Fine structure of the choriocapillaries and retinal capillaries. Invest.Ophthal. 4, 1016-1025 (1965)

BOMMER, S.: Hautuntersuchung in gefiltertem Quarzlicht. I. Mitteilung. Derm.Wschr. 82, 637-644 (1926)

DOLLERY, C.T., HODGE, J.V. & ENGEL, M.: Studies of the retinal circulation with fluorescein. Brit.med.J. II, 1210-1215 (1962)

EMMART, E.W.: Observations on the absorption spectra of fluorescein, fluorescein derivatives and conjugates. Arch.Biochem. 73, 1-8 (1958)

EMMERSON, G.A. & ANDERSON, H.H.: Toxicity of certain proposed antileprosy dyes: fluorescein, eosin, erythrosin and others. Int.J.Leprosy 2, 257 (1934)

FERRER, O.M.: Serial fluorescein fundus photography of retinal circulation. A description of technique. Amer.J. Ophthal. 60, 587-591 (1965)

FRANÇON, M.: Einführungen in die neueren Methoden der Lichtmikroskopie. S.217-229, Braun: Karlsruhe (1967)

GARWEG, G. & KORTMANN, H.: Die infundibulären Zonen der normalen und adrenalektomierten Maus in der Kryostat- und Paraffinschnitt Autoradiographie. Z.Zellforsch. 92, 94-114 (1968)

GÄRTNER, J.: Elektronenmikroskopische Beobachtungen zur Morphologie der Blut-Hirnschranke an Netzhautgefäßen des Menschen. Graefes Arch.Ophthal. 171, 134-161 (1966)

GOLDMANN, H.: Über Fluorescein in der menschlichen Vorderkammer. Das Kammerwasser-Minutenvolumen des Menschen. Ophthalmologica (Basel) 119, 65-95 (1950)

GOLDMANN, H.: Abflußdruck, Minutenvolumen und Widerstand der Kammerwasserströmung beim Menschen. Docum.ophthal. 5-6, 278-356 (1951)

GRAFFLIN, A.L.: The excretion of fluorescein by the liver under normal and abnormal conditions, observed in vivo with the fluorescence microscope. Amer.J. Anat. 81, 63-116 (1947)

GRAYSON, M.C. & LATIES, A.M.: Ocular localisation of sodium fluorescein. Arch.Ophthal. (Chicago) 85, 600-609 (1971)

HAINING, W.M. & LANCASTER, R.C.: Advanced techniques for fluorescein angiography. Arch.Ophthal. (Chicago) 79, 10-15 (1968)

HAITINGER, M.: Fluoreszenzmikroskopie. 2.Aufl., Geest und Portig: Leipzig (1959)

HEYDENREICH, A.: Mikroskopisch-histologische Untersuchungsmethoden unter besonderer Berücksichtigung des Sehorgans. Edition: Leipzig (1968)

HICKAM, J.B. & FRAYSER, R.: A photographic method for measuring the mean retinal circulation time using fluorescein. Invest.Ophthal. 4, 876-884 (1965)

HODGE, J.V. & DOLLERY, C.T.: Retinal soft exudates: A clinical study by colour and fluorescence photography. Quart.J.Med. 33, 117-131 (1964)

HODGE, J.V. & CLEMETT, R.S.: Improved method for fluorescence angiography of the retina. Amer.J.Ophthal. 61, 1400-1404 (1966)

HOGAN, M.J. & FEENEY, L.: The ultrastructure of the retinal blood vessels. I: The large vessels. J.Ultrastruct.Res. 9, 10-28 (1963a)

HOGAN, M.J. & FEENEY, L.: The ultrastructure of the retinal vessels. II: The small vessels. J.Ultrastruct. Res. 9, 29-46 (1963b)

HYVÄRINEN, L., HOCHHEIMER, B. & GEORGE, T.W.: Evaluation of filters for fluorescein angiography. In: AMALRIC, P.: Proc.int.Symp.Fluorescein Angiography, Albi, 1969. S.72-75. Karger: Basel (1971)

JAH, S.-U.M.: Farbstoffnachweis in Geweben und Flüssigkeiten des Körpers und des Auges beim Kaninchen nach i.v. Fluorescein-Natrium-Injektion. Diss. Bonn (1970)

KRÜGER, G.: Vergleichende Untersuchungen zur Technik der Fluoreszenz-Angiographie. Diss. Bonn (1967)

KOCH, K.-F.: Fluoreszenzmikroskopie. Instrumente, Methoden, Anwendung. Leitz: Wetzlar (1972)

LANGE, K. & BOYD, L.J.: The use of fluorescein to determine the adequacy of circulation. Med.Clin.N.Amer. 26, 943 (1942)

LANGE, K. & BOYD, L.J.: The technique of the fluorescein test to determine the adequacy of circulation in peripheral vascular diseases, the circulation time and capillary permeability. Bull.N.Y.med.Coll. 6, 78 (1943)

LAURENCE, D.J.R.: A study of the adsorption of dyes on bovine serum albumine by the method of polarisation of fluorescence. Biochem.J. 51, 168-180 (1952)

MERYMAN, H.T.: Principles of freeze-drying. Ann.N.Y.Acad.Sci. 85, 630-679 (1960)

MIZUNO, K.: Histochemical identification of fluorescein in retina. Folia ophthal.jap. 23, 372-378 (1972a)

MIZUNO, K.: Fluorescein histochemistry of retina by incident light fluorescence microscopy. Jap.J.clin.Ophthal. 26, 1233-1239 (1972b)

MIZUNO, K., SASAKI, K. & OTSUKI, K.: Histochemical interpretation of fluorescein angiogram. Graefes Arch. Ophthal. 188, 33-42 (1973)

MIZUNO, K., SASAKI, K. & OTSUKI, K.: Histochemical identification of fluorescein in ocular tissue. In: SHIMIZU, K.: Fluorescein Angiography. Igaku Shoin: Tokyo (1974)

NOVOTNY, H.R. & ALVIS, D.L.: A method of photographing fluorescence in circulating blood of the human eye. Amer.J.Ophthal. 50, 176 (1960)

NOVOTNY, H.R. & ALVIS, D.L.: A method of photographing fluorescence in circulating blood in the human retina. Circulation 24, 82-86 (1961)

NAIRN, R.C.: Fluorescent protein tracing. 2.Aufl., Livingstone: Edinburgh (1964)

OOSTERHUIS, J.A. & LAMMENS, A.J.J.: Fluorescein photography of the ocular fundus. Ophthalmologica (Basel) 149, 210-220 (1965)

OTA, M. & TSUKAHARA, J.: Fluorescein microscopic studies on fundus fluorescein angiography. Acta Soc.ophthal. jap. 75, 1856-1862 (1971)

PEARSE, A.G.E.: Histochemistry. 2 Bde. 3.Aufl. Churchill Livingstone: Edinburgh & London (1972)

ROHEN, J.W.: Permeabilität und Gefäßstruktur. Dtsch.Ärztebl. 65, 677-684 (1968)

SASAKI, K.: pers.Mitteilung (1973)

SASAKI, K., OTSUKI, K. & MIZUNO, K.: Histochemical identification of fluorescein sodium in normal retina. Jap.J.Ophthal. 17, 323-334 (1973)

SASAKI, K., LEMMINGSON, W., BAURMANN, H., CHIORALIA, G. & HENDRICKSON, P.: Observation of injected fluorescein diffusion after laser treatment of cat fundi. Graefes Arch.Ophthal. 198, 7-16 (1976)

SCHARF, J.H.: Fluoreszenz und Fluoreszenzpolarisation der Nervenfasern nach Färbung mit Phenyloxyfluoronen. Versuch einer Interpretation. Mikroskopie (Wien) 11, 261-319, 349-397 (1956)

SCOTT, D.J., DOLLERY, C.T., HILL, D.W., HODGE, J.V. & FRAYSER, R.: Fluorescein studies of diabetic retinopathy. Brit.med.J. I, 811-814 (1964)

SHAKIB, M. & CUNHA-VAZ, J.G.: Studies on the permeability of the blood-retinal barrier. 4. Junctional complexes of the retinal vessels and their role in the permeability of the blood-retinal barrier. Exp.Eye Res. 5, 229-234 (1966)

SHAKIB, M., CUNHA-VAZ, J.G. & KEITH, C.G.: Studies on the effect of osmotically active substances on the circulation and structure of the retina. II: Electron-microscopical studies. Invest.Ophthal. 6, 198-206 (1967)

SOLLOM, A.W.: Ocular tissue staining in the rabbit after fluorescein injection. Exp.Eye Res. 7, 551-555 (1968)

SOLLOM, A.W. & BROWN, I.A.R.: Histological study of late phase fluorescence in the rabbit fundus. Brit.J.Ophthal. 51, 821-828 (1967)

STÜBEL, H.: Die Fluoreszenz tierischer Gewebe in ultraviolettem Licht. Pflügers Arch.ges.Physiol. 142, 1-14 (1911)

WESSING, A.: Fluoreszenz-Angiographie der Retina. Thieme: Stuttgart (1968)

ZAREN, H.A., HEDGES, T.R., BOYT, V.R. & HEDGES III, T.R.: Fluorescent studies of orbital and intracranial pathology. Preliminary report. J.neurol.Sci. 5, 93 (1967)

Lebenslauf

Am 30.5.1940 wurde ich, Gabriela Chioralia, als Tochter des Diplom-Ekonomisten Constantin Chioralia und seiner Ehefrau Elena Rodica, geb. Vasilescu, in Bukarest/Rumänien geboren.
Vom Herbst 1946 bis Sommer 1948 besuchte ich die deutsch-katholische Volksschule Pitar Mosi in Bukarest. Als diese Schule geschlossen wurde, wechselte ich auf eine rumänische Volksschule, die ich bis Sommer 1949 besuchte.
Im September 1949 erkrankte ich an Kinderlähmung, deshalb erhielt ich bis Sommer 1953 Privatunterricht.
Ab Herbst 1953 besuchte ich das Gymnasium in Bukarest, wo ich im Juni 1960 das Abitur ablegte.
Aus politischen Gründen wurde mir die Zulassung zum Hochschulstudium verweigert. Ab Oktober 1960 bis September 1972 arbeitete ich im Rehabilitationszentrum in Bukarest, um dadurch die Berechtigung zum Studium zu erlangen. Oktober 1962 konnte ich mein Studium an der Naturwissenschaftlichen Fakultät Bukarest beginnen, jedoch nur unter Beibehaltung der bisherigen Arbeitsstelle. Im Juli 1967 beendete ich mit Staatsexamen und Diplom mein Studium.
Am 12. September 1972 verließ ich Rumänien.
Seit dem 1. Februar 1973 bin ich in der Universitäts-Augenklinik Bonn als Wissenschaftliche Angestellte tätig.